Biotecnologie Cellulari

In questo corso si studia la biotecnologia, la scienza della vita.
È una scienza applicativa che si occupa di trovare quelle tecnologie che si nascondono nelle cellule, è infatti una disciplina dove sia le cellule che le scoperte che derivano da microrganismi sono utilizzati nella ricerca, nell'industria e nella clinica.
Questa scienza ha vari aspetti:

- uso di tecniche di biologia molecolare sono usate per ingegnerizzare, cioè modificare il genoma di animali o piante per migliorare la loro idoneità per applicazioni industriali, farmaceutiche o agricole;
- uso dell'immunologia applicata, la quale fornisce servizi per sostenere lo sviluppo di terapie biologiche, come anticorpi monoclonali, vaccini o diagnostici;
- uso di una vasta gamma di metodi sperimentali per misurare la quantità o l'attività di una sostanza;
- produzione di sostanze varie attraverso metodi biotecnologici piuttosto che con sintesi chimica;
- produzione e uso di biomateriali, materiali che si interfacciano bene con i sistemi biologici.

Essendo una scienza applicativa servono delle industrie in grado di produrre i materiali necessari.
La proprietà intellettuale serve a tutelare le idee e le invenzioni, e comprende:

1) brevetto: solo dopo la sua scadenza altre aziende possono produrre il prodotto protetto;
2) marchi depositati;
3) capyright.

Ci sono dei valori etici fondamentali che le industrie biotecnologiche devono rispettare:

1) divieto di sviluppo e uso di armi biologiche;
2) mantenere la diversità genetica degli organismi;
3) non modificare geni della linea germinale nell'uomo;
4) non clonare esseri umani;
5) sviluppare animali trans-genici seguendo i regolamenti;
6) tutela della riservatezza e dell'uso improprio delle informazioni genetiche e mediche.

Esistono delle associazioni che finanziano lo sviluppo e producono quindi biotecnologie.
Queste industrie si distinguono in 3 gruppi in base a ciò di cui si occupano:

- biotecnologie rosse: si occupano della salute dell'uomo e degli animali;
- biotecnologie verdi: si occupano dell'agricoltura e dell'alimentazione;
- biotecnologie bianche: si occupano dell'industria.

"**La biotecnologia è l'applicazione tecnologica che si serve dei sistemi biologici, degli organismi viventi o di derivati di questi per produrre o modificare prodotti o processi per un fine specifico**".

In senso lato le biotecnologie sono processi usati da sempre, ad esempio migliaia di anni fa l'essere umano iniziò ad usare, inconsapevolmente, i microrganismi (es. lieviti selvatici portati dal vento) per produrre cibi e bevande ed a modificare piante ed animali attraverso una graduale selezione dei caratteri desiderati.
Già dal 6000 a.C. Sumeri e Babilonesi usavano i lieviti per produrre vino e birra, nel 4000 a.C. gli stessi lieviti venivano usati dagli Egizi per produrre pane lievitato, attorno al 1521 d.C. gli Aztechi usavano come alimento le alghe marine, mentre in Oriente la fermentazione produceva la salsa di soia.
Lo stesso vale per gli antibiotici che si usavano senza sapere cosa fossero.
Alla finte tra 1500 e 1600 quando si cominciano ad inventare i primi microscopi vennero fuori le prime scoperte come ad esempio i batteri, e ciò fu possibile grazie alla tecnologia delle lenti.
A metà dell'800 si scopre il batterio Escherichia coli ed i cromosomi.
In seguito all'evolversi della tecnologia delle lenti si è riusciti a vedere sempre più nel dettaglio, fino al nucleo delle cellule ed ai lieviti.

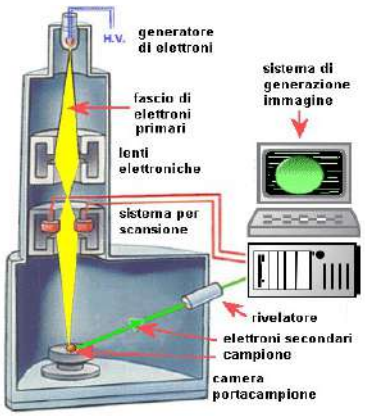
La rivoluzione che è stata fondamentale e che ha segnato la fine della biologia classica e l'inizio delle biotecnologie è stata la scoperta della struttura tridimensionale del DNA, poiché da qui si è scoperto come funzionava il codice genetico e si iniziarono a fare i primi esperimenti sul DNA ricombinante.

Il problema per chi studia le cellule è che queste non si vedono, l'occhio riesce a vedere due punti distinti fino a 200 micron (0,2 mm).

I MICROSCOPI

Stereo-microscopi:
Sono caratterizzati da una visione 3D di ciò che si sta osservando in quanto sono dotati di coppie di obiettivi e oculari che lavorano simultaneamente.
Si hanno immagini leggermente diversamente angolate agli occhi destro e sinistro, in questo modo si produce una visione stereoscopica del campione in esame.
Di solito questi tipi di strumenti hanno ingrandimenti che variano da 10x a 90x, ma possono arrivare fino a 180x nel caso di strumenti più sofisticati e per scopi professionali.
Gli stereo-microscopi sono adatti all'osservazione di insetti, foglie, pietre, o comunque oggetti opachi e dotati di un certo spessore, sono molto utili anche per l'osservazione di circuiti elettronici, fibre o tessuti.
Sono utilizzati come microscopi di dissezione, funzionano a luce riflessa, e ci consente di vedere soltanto l'esterno.

Microscopio elettronico a scansione (SEM):
Non sfrutta la luce come sorgente di radiazioni, ma un fascio di elettroni che colpiscono il campione (sempre riflesso), questo fascio viene accelerato verso l'anodo, e dal campione vengono emesse numerose particelle fra le quali gli elettroni secondari, i quali vengono rilevati da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici.
Il fascio non è fisso ma viene fatto *scandire*, cioè viene fatto passare sul campione in sequenza.
Il segnale degli elettroni secondari viene mandato ad uno schermo dove viene eseguita una scansione analoga, il risultato è un'immagine in bianco e nero che ha caratteristiche simili a quelle di una normale immagine fotografica, per questa ragione le immagini SEM sono intuitive da comprendere.



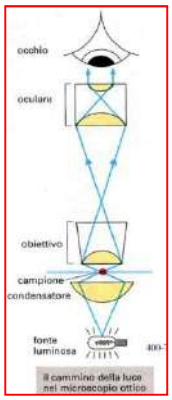
Il potere di risoluzione di un normale microscopio elettronico SEM a catodo di tungsteno si aggira intorno ai 5 nm, ma alcuni modelli arrivano a 1 nm, e l'immagine SEM ha un'elevata profondità di campo e sono in 3D.
Esiste la possibilità di fare degli pseudo-colori sulle immagini ricavate, sono colori fatti al pc con programmi che scambiano automaticamente i vari toni di grigio con dei colori.
Il campione è sotto vuoto poiché l'aria impedirebbe la produzione del fascio, e deve essere conduttivo o metallizzato, altrimenti produce cariche elettrostatiche che disturbano la rivelazione dei secondari.

Preparazione dei campioni per SEM:

- Stabilizzazione-Fissazione chimica: ciò va fatto poiché i campioni biologici sono molli, quindi si esegue una prefissazione con glutaraldeide e una post fissazione in tetrossido di osmio, poi si esegue una disidratazione in etanolo in modo graduale (50-70 90-100);
- Essiccamento (Critical Point Dryer): i campioni devono essere completamente privi di qualunque materiale liquido che possa vaporizzare nel vuoto, il raggiungimento del punto critico consente di trasformare l'etanolo liquido in gas senza attraversare la fase di vapore;
- Montaggio: il campione va messo su un supporto in genere di alluminio
- Coating: il campione va rivestito con metalli pesanti o oro per migliorare il contrasto di immagine prima dell'esame al microscopio.

Microscopio ottico e TEM: (il TEM continua a pagina 29)

Il TEM ed il microscopio ottico funzionano a luce trasmessa.
È una differenza fondamentale, in questo caso il campione si vede grazie al fatto che la fonte di luce va a illuminare il preparato, gli elettroni passano o meno attraverso il prepara in base al materia del campione, si otterrà così una zona scura se non riescono a passare il materiale, chiara se ci riescono.



I microscopi ottici, che utilizzano la lunghezza d'onda della luce visibile (400-700 nm), una luce bianca, sono i più semplici e quelli di più comune utilizzo, sono costituiti da un sistema di lenti atte a focalizzare la luce nell'occhio o in un altro dispositivo rivelatore.
Gli ingrandimenti tipici dei microscopi ottici, all'interno dello spettro di luce visibile, sono fino a 1500x con un limite di risoluzione teorica di circa 0,2 µm.
Si ha un condensatore che condensa i raggi di luce sul campione, i raggi sono poi raccolti dall'obiettivo (modificati o no dal campione).
Vi è poi l'oculare, il secondo sistema di lenti che consente di ottenere un'immagine virtuale rovesciata ingrandita.

L'ingrandimento geometrico del microscopio è uguale al prodotto dei due ingrandimenti dell'obiettivo e dell'oculare, per esempio un obiettivo 4x unito ad un oculare 10x darà 40 ingrandimenti.
INGRANDIMENTO: è la capacità di fornire un'immagine ingrandita dell'oggetto osservato, questo non determina un aumento di risoluzione delle immagine;
POTERE DI RISOLUZIONE: è la capacità di distinguere come distinti due punti adiacenti, il potere risolutivo dello strumento di osservazione determina il livello di dettaglio contenuto nell'immagine.
Il potere di risoluzione del microscopio dipende dalla lunghezza d'onda della luce e dall'apertura numerica del sistema di lenti, dipende dalla larghezza del cono d'illuminazione, perciò sia dal condensatore che dall'obiettivo.
Si calcola usando la formula risoluzione $= \frac{0{,}61\,\lambda}{n \sin\theta}$ in cui:
Θ = metà della larghezza angolare del cono di raggi racolti dall'obiettivo da un punto tipico del capione, e poiché la larghezza massima è di 180°, sin (Θ) ha un valore massimo di 1;
n = indice di rifrazione del mezzo, in genere olio o aria, che separa il campione dell'obiettivo e dal condensatore;
λ = lunghezza d'onda della luce usata, in genere per la luce bianca si assume un valore di 0,53 micron;
n sin (Θ) = apertura numerica della lente, è una funzione della sua capacità di raccogliere luce, per lenti ad aria non può essere superiore a 1, per lenti ad immersione in olio può raggiungere 1,4.

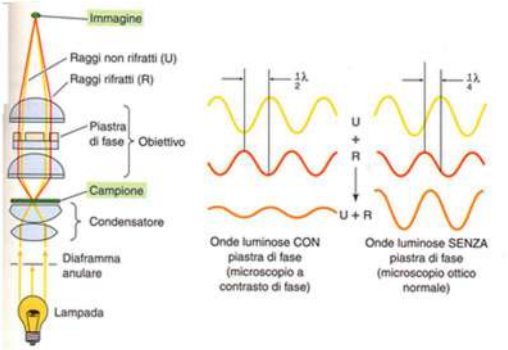
L'olio da immersione ha un indice di rifrazione (n) pari a 1,51 e l'obiettivo ad immersione ha un massimo angolo di accettazione della luce pari a 137°, inserendo questi dati nella formula sopra citata si avrà un'apertura numerica = 1,51 sen $\frac{1}{2*137°}$ = 1,4.
L'olio interposto permette in pratica lo sfruttamento di un maggiore cono di luce, poiché la luce stessa viaggia in un mezzo con un indice di rifrazione uniforme e non risente della totale rifrazione che alcuni raggi luminosi hanno nel passare dal vetro all'aria e poi di nuovo al vetro.
Aumentando il tiraggio del tubo o proiettando l'immagine su di uno schermo lontano si potrebbero raggiungere ingrandimenti molto maggiori ma il potere risolutivo, che è funzione della lunghezza d'onda della luce visibile, non ne sarebbe in alcun modo incrementato.

Microscopio ottico invertito:
È un particolare tipo di microscopio composto, nel quale il preparato è illuminato dall'alto e osservato dal basso .
Sotto il preparato si trova infatti un prisma che riflette i raggi luminosi nel tubo ottico, grazie a questo accorgimento è possibile osservare reazioni chimiche senza che i gas o le effervescenze da esse generate disturbino la visione, per tale ragione i microscopi di questo tipo sono anche detti chimici.

Sono adatti anche alla visualizzazione di preparati in capsule petri o fiasche per la coltura dei tessuti, ci dà inoltre il vantaggio che si possono visualizzare delle strutture che sono dentro un liquido.

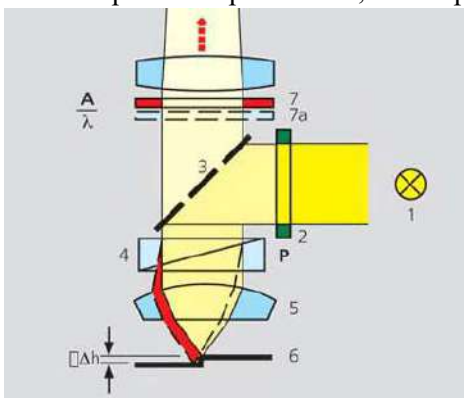
Microscopio invertivo a contrasto di fase:

Il dettaglio con questa ottica diventa più evidente anche senza colorazione.
In questo tipo di microscopio è stata inserita una piastra a contrasto di fase che produce uno sfasamento di un quarto di lunghezza d'onda tra due fasci paralleli incidenti sul campione, incrementa così le differenze di contrasto tra il campione e il mezzo circostante e porta alla visualizzazione di una immagine netta su campo chiaro.



Microscopio a contrasto differenziale interferenziale (DIC):

Il procedimento teorico di questo metodo è abbastanza complesso, la luce proveniente della sorgente di illuminazione viene fatta passare attraverso un polarizzatore situato sotto il condensatore, in modo simile alla microscopia a luce polarizzata, la luce polarizzata quindi passa attraverso un prisma che divide il fascio di luce in due fasci che sono in grado di ricombinarsi per causare interferenze.



La distanza tra i due fasci si chiama distanza "shear", ed è sempre inferiore alla capacità di risolvenza dell'obiettivo, questo per evitare la comparsa di immagini doppie.
I fasci di luce, divisi, passano attraverso il campione dove i loro percorsi sono alterati causa il diverso spessore del preparato e il suo indice di rifrazione, quando i raggi paralleli entrano nell'obiettivo, vengono concentrati al di sopra del piano focale, dove entrano in un secondo prisma che ricombina i due fasci in una distanza definita al di fuori del prisma.
Ciò elimina lo "shear" e la differenza di percorso originale tra la coppia di raggi, tuttavia, i raggi paralleli non hanno più la stessa lunghezza a causa dei cambi di percorso causati dal campione.
Fa apparire luminoso o colorato un lato dell'oggetto, mentre l'altro appare più scuro o di un colore diverso, le immagini quindi possono essere viste anche a colori
Il DIC inoltre, è superbo per lo studio delle cellule viventi, in quanto non è invasivo e offre la possibilità, in tempo reale, di seguire con facilità la circolazione di piccoli organelli all'interno delle cellule.
Ci sono però diversi svantaggi, le attrezzature necessarie per questa tecnica sono molto costose a causa dei tanti prismi che sono necessari, preparati birifrangenti, come quelli relativi a molti tipi di cristalli, possono non essere adatti a causa del loro effetto sulla luce polarizzata.

Microscopia in campo oscuro (dark field):

Il microscopio a campo scuro ha un sistema di illuminazione modificato che raggiunge il preparato lateralmente, in questo modo l'unica luce che raggiunge l'obiettivo è quella riflessa dal campione, che appare quindi chiaro in un campo scuro.
La microscopia in campo oscuro è una tecnica di contrasto consigliabile per i preparati che hanno un indice di rifrazione diverso dal loro mezzo circostante, ma che sono difficili da vedere perché non hanno colore.
Per ottenere un'immagine in campo oscuro, è necessario posizionare un filtro scuro nel portafiltro del condensatore, questo filtro impedisce alla luce della lampada di entrare direttamente nell'obiettivo, il campione è illuminato lateralmente e parte della luce che dovrebbe raggiungere l'obiettivo viene dispersa, il campione appare chiaro su sfondo scuro.
Si tratta di una procedura semplice che può essere utilizzata su esemplari vivi, evitando la colorazione dei campioni, tecnica che potrebbe portare alla morte dei soggetti.

La microscopia in campo oscuro permette anche la visualizzazione di oggetti che sono al di sotto della risoluzione del microscopio, questi oggetti appariranno come macchie luminose su uno sfondo scuro, non sarà possibile, comunque, vedere in modo dettagliato la forma di questi oggetti.

ESAME A FRESCO

Si ha difficoltà a mantenere in vita le cellule od i tessuti isolati (necrosi, degradazione), e si hanno limitate possibilità di colorazione (coloranti vitali).

Coloranti vitali:
Ciascuno ha delle affinità per tipi di cellule e strutture citoplasmatiche particolari, e quindi la scelta del colorante viene fatta sulla base dell'esperienza.

- coloranti acidi: le sostanze basiche che si trovano nei tessuti possiedono affinità per i coloranti acidi, acidofilia o eosinofilia; (esempi di coloranti: alizarina, blu pirrolo, rosso congo, inchiostro di china, carminato di ammonio)
- coloranti basici: le sostanze acide che si trovano nei tessuti possiedono affinità per i coloranti basici, basofilia; (esempi di coloranti: blu di metilene, azzurro di metilene, solfato di blu di Nilo, blu di cresile brillante, verde Janus)
- coloranti indifferenti: rosso neutro.

Ad esempio l'ematossilina, basica, colora il nucleo in blu, l'eosina, acida, colora il citoplasma in rosa.
Oppure la fucsina acida tinge in rosso i nuclei, l'azzurro di anilina conferisce al connettivo collageno una tonalità azzurra, l'orange G colora i citoplasmi in arancione.
La colorazione di Golgi sono coloranti particolari di nitrato di argento per colorare le cellule nervose.

La preparazione di materiale istologico: FISSAZIONE

Ha lo scopo di bloccare la lisi delle cellule e dei tessuti e di:

1) alterare il meno possibile la reale struttura cellulare;
2) preservarle da crescite di batteri e funghi;
3) indurire il tessuto per renderlo resistente ai trattamenti successivi.

La fissazione consiste nella stabilizzazione fisica e chimica dei costituenti cellulari e tissulari in uno stato il più vicino possibile a quello della materia vivente e tale da consentire l'allestimento di preparati microscopici. Le strutture biologiche che si intendono studiare devono essere preservate dalle alterazioni post-mortem determinate dagli enzimi autolitici presenti in ogni cellula, dagli enzimi ed agenti litici speciali di singoli organi, dagli enzimi litici esogeni, prodotti da batteri.

Di solito si usa il calore in microbiologia o per strisci di sangue in passato, ora si usano spray idonei, mentre il congelamento viene usato in chirurgia.

Vetrificazione dell'acqua:
Comportamento dell'acqua in una particolare condizione termica, l'acqua sotto-raffreddata ad una temperatura critica di -43 gradi subisce un deciso mutamento nei suoi moti interni, diventa allo stato amorfo (vetrificazione), ma senza per questo modificare in maniera significativa le sue strutture.

Requisiti della fissazione:

- precocità: la possibilità di un tessuto di resistere alle alterazioni post-mortem varia da tessuto a tessuto ed è anche in funzione dello stato funzionale e della eventuale patologia del tessuto medesimo;
- piccole dimensioni del frammento da fissare: gli agenti fissativi penetrano nel tessuto dalla superficie verso l'interno;
- idoneo mezzo di fissazione: a seconda del tipo di studi che si intendono eseguire, spesso è necessario l'impiego di metodi fissativi differenti su frammenti dello stesso materiale biologico;
- abbondanza del mezzo fissativo: nel caso di agenti fissativi chimici in soluzione.

Artefatti da fissazione:

- coartazione dei tessuti, con possibili distacchi tra tessuti di diversa consistenza e con diverso contenuto in acqua;
- rigonfiamento di tutto il tessuto o di alcune sue parti;
- indurimento eccessivo del tessuto;
- estrazione di sostanze, solubili negli agenti fissativi;
- alterazione di gruppi chimici, per reazione con gli agenti fissativi.

Metodi fisici di fissazione:
Non si può parlare di fissativo ma di un sistema di conservazione.
Il freddo, ad esempio, non è un agente fissativo in senso stretto, ma piuttosto un agente conservante, deve essere quanto più rapido possibile, per ottenere un rapido congelamento si devono trattare pezzi molto piccoli con azoto liquido, a -170 °C.
Solo così si evita la formazione di grossi cristalli di ghiaccio, capaci di alterare profondamente la struttura dei tessuti, un congelamento particolarmente rapido può impedire del tutto la cristallizzazione dell'acqua, stabilizzandola in uno stato solido amorfo, come il vetro (vetrificazione dell'acqua).
I cristalli possono essere fatti sublimare per disidratazione sotto vuoto a temperature fra -60°C e -30°C.

Il criostato:
I criostati sono apparecchi usati per sezionare tessuti congelati, costituiti da una camera refrigerata contenente un microtomo, cioè uno strumento per ottenere sezioni istologiche, anch'esso refrigerato.
Le sezioni che si ottengono si presentano all'osservazione in una forma il più possibile simile a quella originale, ma spesso la presenza di cristalli di ghiaccio impedisce di cogliere alcuni particolari morfologici.
Fissati e poi passati 1 h in saccarosio 20% prima di includerli in *Tissue Tek* OCT, quest'ultimo dopo il taglio e la fissazione su vetrino viene lavato via.

Metodi chimici di fissazione:
I composti utilizzati come fissativi in istologia possono essere suddivisi in 4 classi chimiche:

1) aldeidi: -CHO;
2) alcoli: -OH;
3) acidi organici e minerali: ad esempio acido acetico, picrico;
4) Sali di metalli pesanti: ad esempio bicromato di potassio.

Alcuni fissativi sono usati singolarmente, ma la maggior parte sono usati in miscele di fissazione unitamente ad altri composti.
Bisogna sapere qual è il fissativo adatto per ciò che si deve andare a fare.

Questi si dividono in due gruppi:

- fissativi coagulanti o precipitanti: denaturano completamente le proteine, non sono adatti per le indagini di istochimica, enzimatiche ed immunoistochimica;
- fissativi non coagulanti: legano fra di loro le proteine che formano un reticolato che intrappola tutte le costituenti protoplasmatiche, l'attività enzimatica viene conservata, e sono adatti per indagini di immunoistochimica, o per lo studio di attività enzimatiche.
  Le aldeidi reattive fissano il tessuto introducendo cross-links fra diverse componenti (proteine, acidi nucleici, lipidi) in modo proporzionale al tempo di fissazione.

Sequenza dei passaggi in una tipica procedura istologica:

1) Prelievo;
2) Fissazione;
3) Lavaggio: si lava via il fissativo;
4) Disidratazione;
5) Chiarificazione: si fa con lo xilolo che si sostituisce gradatamente all'etanolo;

6) Inclusione: se il campione non si è indurito abbastanza, in genere si usa la paraffina, ma non penetrerebbe all'interno del tessuto;
7) Sezionamento: il microtomo funziona a temperatura ambiente e fa delle fettine di qualche micron;
8) Sparaffinazione: è fatta in solventi organici ed elimina la paraffina dalle fette;
9) Reidratazione: si mette il campione su un vetrino ad asciugare, una volta asciutte si deve rifare la chiarificazione per togliere la paraffina con xilolo, e poi si reidrata con etanolo sempre gradualmente;
10) Colorazione;
11) Disidratazione: il campione deve essere fissato per renderlo stabile su vetrino con delle colle ottiche;
12) Montaggio;
13) Osservazione.

ISTOLOGIA FUNZIONALE

L'istologia moderna non si limita all'osservazione descrittiva degli aspetti morfologici e strutturali di base di cellule e tessuti.
Esistono numerose tecniche che consentono di rispondere ai quesiti specifici con aspetti funzionali.

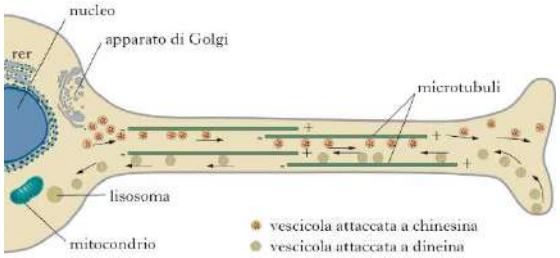
ISTOLOGIA FUNZIONALE IN NEUROSCIENZE

Con la colorazione di Golgi si ottiene una reazione con cromato di argento, la quale ci dice la morfologia dei neuroni, ma non ci dice nulla di come sono connessi tra loro.
Si possono conoscere gli aspetti funzionali utilizzando colorazioni particolari, il neuronal trasing.

Il trasporto intracellulare di proteine e organelli è fondamentale per la sopravvivenza delle cellule ma, dal momento che i neuroni sono cellule estremamente polarizzate, nel sistema nervoso tale processo assume caratteristiche peculiari.

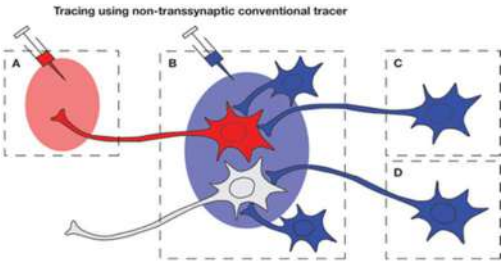
I neuroni infatti hanno un corpo cellulare che si prolunga con assoni e dendriti, e spesso tali strutture proiettano a considerevole distanza l'uno dagli altri.
All'interno di uno stesso assone, i differenti componenti cellulari da trasportare devono essere spostati verso specifici compartimenti subcellulari, e classicamente vengono distinti due tipi di trasporto lungo l'assone, che si diversificano per velocità e tipo di cargo:

- il trasporto in senso anterogrado, cioè dal corpo cellulare verso le terminazioni assoniche, viene utilizzato per il trasporto di tutti i componenti membranosi di nuova sintesi che devono raggiungere le terminazioni nervose.
  È promosso da molecole di chinesina, vescicole di piccole dimensioni rilasciate dall'apparato del Golgi aderiscono ai microtubuli e viaggiano verso la terminazione sinaptica;
- il trasporto retrogrado, in direzione opposta, e invece finalizzato al riciclo degli stessi.
  È promosso da molecole di dineina, vescicole di endocitosi, piu grandi delle precedenti, scorrono in direzione opposta riciclando materiale che deve essere elaborato dopo la fusione con i lisosomi.

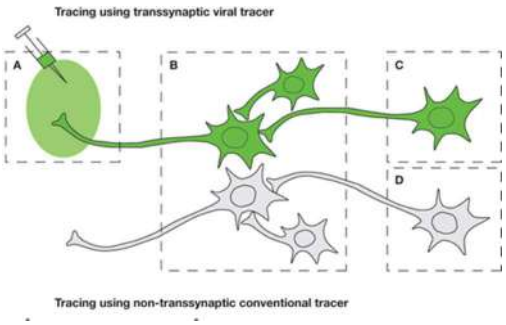


Il traffico si svolge poi a due diverse velocità (rapido o lento).

Il movimento di strutture subcellulari nei processi nervosi era prima studiato tramite l'uso di traccianti 'caldi', cioè marcando le proteine sintetizzate nei corpi cellulari dei gangli delle radici dorsali per iniezione di amminoacidi radioattivi.
Il tracciamento delle vie dei neuroni è stata eseguita utilizzando una vasta gamma di sonde fluorescenti e non fluorescenti.



Traccianti convenzionali: devono essere condotti diversi esperimenti con differenti siti di iniezione in modo da rivelare i circuiti neurali afferenti.
(coloranti lipofilici, lectine, microsphere)



Traccianti virali trans-sinaptici: permette di tracciare catene di neuroni specifici, iniettati localmente usano recettori sulla cellula ospite per essere poi internalizzati per endocitosi e trasportati al corpo cellulare attraverso il citoscheletro.
(virus ricombinanti)

Iniettando un tracciante virale retrograda in regione A, il virus prima di infetta i neuroni che proiettano direttamente al sito di iniezione nella regione B, e poi si diffondono ulteriormente i neuroni a monte sinapticamente collegati nella regione C.
Pertanto, l'etichettatura trans-synaptic ci permette di rintracciare catene di neuroni specifici, come i neuroni di proiezione che inter-collegano distinte regioni cerebrali o interneuroni che modulano l'attività di tali neuroni di proiezione.
Utilizzando traccianti non trans-synaptic convenzionali, diversi esperimenti con diversi siti di iniezione devono essere effettuate al fine di rivelare i circuiti neurali afferenti: l'iniezione nella regione A per rilevare i neuroni del primo ordine, e l'iniezione nella regione B per rilevare il secondo ordine di neuroni. Tuttavia, in questo modo, i neuroni che non sono collegati con il circuito A possono anche essere colorati.

ISTOCHIMICA

Comprende le reazioni chimiche che si utilizzano per la localizzazione cellulare e tissutale dei vari costituenti, e in particolare dei lipidi, dei polisaccaridi, delle proteine e degli acidi nucleici.

Reazioni per i lipidi:
Nelle tecniche comuni delle fette i lipidi contenuti nelle cellule vengono estratti, pertanto, per il loro studio si usano sezioni al criostato.
In tali sezioni i lipidi vengono evidenziati mediante coloranti liposolubili, ad esempio il sudan nero o il rosso congo, tali coloranti si sciolgono nei grassi contenuti nelle cellule per la maggiore affinità verso i grassi rispetto al solvente in cui sono disciolti, in genere alcool etilico.

Reazione PAS:
Acido Periodico/Schiff, per i polisaccaridi neutri come glicogeno o mucina.
I gruppi ossidrili (-OH) degli zuccheri sono ossidati dall'acido periodico con la formazione gruppi aldeidici (-CHO).
Il reattivo di Schiff che è incolore reagisce con tali gruppi virando a rosso-magenta.

IMMUNOISTOCHIMICA

Tecnica preferenziale per l'individuazione di specifici componenti cellulari o tissutali, tale metodica fa uso di anticorpi che agiscono selettivamente contro un determinato componente cellulare o tissutale, detto antigene.
Si possono usare contemporaneamente più anticorpi diretti contro differenti sostanze e marcati con molecole fluorescenti diverse, ciò consente di visualizzare la reciproca localizzazione degli antigeni.

FLUORESCENZA

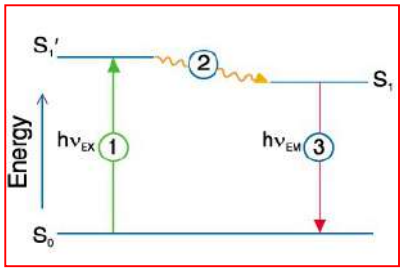
La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze, detti fluorofori, di riemettere a frequenza più bassa le radiazioni ricevute.

Questo è un fenomeno radiativo simile alla fosforescenza, la distinzione tra i due sta nel tempo di vita della radiazione emessa dopo aver eliminato la sorgente eccitante: nella fluorescenza la luminescenza cessa quasi subito dopo aver eliminato la radiazione eccitante, mentre nella fosforescenza la radiazione continua ad essere emessa, almeno per un breve lasso di tempo, anche dopo aver eliminato la sorgente eccitante.

SONDE FLUORESCENTI

Sostanze che permettono di rivelare componenti particolari di sistemi biologici complessi, come tessuti e cellule, sia fissati che in coltura, con una straordinaria sensibilità e selettività
Queste sostanze, grandemente sviluppate nel corso dell'ultimo decennio, sono ormai centinaia, ed utilizzabili per scopi differenziati e con tecniche diverse.
La maggior parte degli anticorpi che si usano per fluorescenza sono sonde fluorescenti, sono infatti anticorpi a cui è stato attaccato un fluoroforo.

Un fluoroforo, o cromoforo fluorescente, viene legato covalentemente ad una macromolecola (sonda).
La luce eccita gli atomi della sostanza fluorescente, facendo saltare gli elettroni in un'orbita più esterna, subito dopo tale eccitazione gli elettroni tornano al livello precedente di energia emettendo luce di lunghezza d'onda maggiore (energia minore).



I tre stadi del processo di fluorescenza sono:
1) assorbimento del fotone di eccitazione;
2) perdita di energia non radiante;
3) rilascio del fotone di fluorescenza.

Fase 1: eccitazione
Viene fornito un fotone di energia da una sorgente esterna, ad esempio una lampada ad incandescenza o laser, e viene assorbito dal fluoroforo, eccitando così l'elettrone allo stato di singoletto (S1').
Questo processo distingue la fluorescenza dalla chemiluminescenza, in cui lo stato eccitato è creato da una reazione chimica.

Fase 2: stato eccitato
Lo stato eccitato ha un tempo finito, tipicamente $1^{-10} \times 10^{-9}$ secondi.
Durante questo tempo il fluoroforo subisce cambiamenti conformazionali ed è soggetto alla moltitudine di possibili interazioni con l'ambiente molecolare.
Questi processi hanno due conseguenze importanti: in primo luogo l'energia di S1 è parzialmente dissipata, da cui proviene la fluorescenza di emissione, in secondo luogo non tutte le molecole inizialmente eccitate dall'assorbimento ritornano allo stato fondamentale di emissione di fluorescenza.
La resa di fluorescenza quantistica, che è il rapporto tra il numero di fotoni emessi dalla fluorescenza e il numero di fotoni assorbiti, è una misura dell'efficienza della fluorescenza.

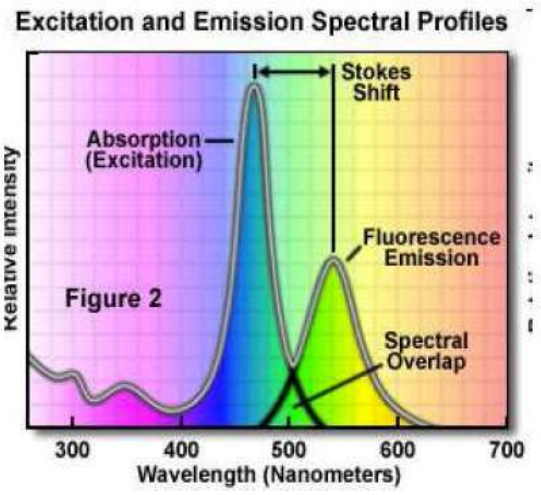


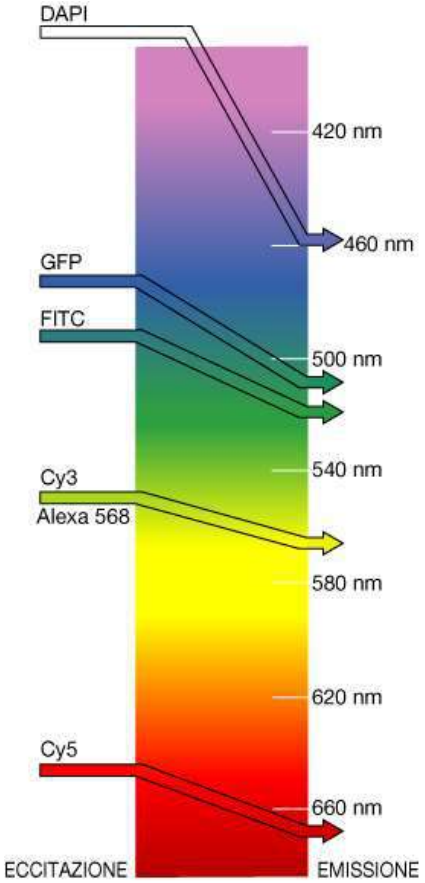
Figure 2

Fase 3: emissione di fluorescenza
Il fotone emette energia restituendo al fluoroforo il suo stato fondamentale.
Grazie alla dissipazione di energia durante lo stato eccitato, l'energia di questo fotone è più bassa, e quindi di lunghezza d'onda maggiore del fotone di l'eccitazione.

Cromoforo: Molecola o sostanza capace di rilevare una tendenza a prendere un determinato colore.
Ogni fluorocromo è caratterizzato da un spettro di emissione ed uno di assorbimento, ciò vuol dire che: un determinato fluorocromo emetterà sempre nel suo spettro di emissione, il quale non cambia in funzione della luce usata per eccitarlo.

FLUOROFORI ORGANICI

Esistono coloranti cito ed istologici che hanno proprietà fluorescenti, e quindi sono essi stessi dei fluorocromi.



DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole):
Assorbe a 358 nm, ultravioletto, ed emette a 460 nm, colore blu, ed è una sostanza che si lega fortemente alle regioni ricche A-T.
Il DAPI può passare attraverso una membrana cellulare intatta, quindi può essere utilizzato per colorare cellule vive, anche se la concentrazione di DAPI necessaria per la colorazione delle cellule vive è generalmente molto superiore che per cellule morte.
È un composto che lega il DNA, quindi è probabile avere alcune proprietà mutagene di basso livello, ma si risolvono con la sua manipolazione o smaltimento.

Hoechst (hesct):
Assorbe a 350 nm, ultravioletto, ed emette a 460 nm, blu.
I coloranti Hoechst sono meno tossici dei DAPI, assicura una maggiore vitalità delle cellule colorate.
I coloranti Hoechst 33258 e Hoechst 33342 sono quelli più comunemente utilizzati e hanno simili spettri di eccitazione/emissione.
Si legano al DNA con una preferenza per le sequenze ricche di A-T, anche se possono legarsi a tutti gli acidi nucleici, e si legano al solco minore del DNA a doppia elica.
Possono legarsi sia a cellule vive che morte.

Ioduro di propidio:
Assorbe a 488 nm, lunghezza d'onda della luce, ed emette a 600 nm, arancione/rosso.
PI si lega al DNA intercalandosi tra le basi con poca/nessuna preferenza delle varie sequenze.
Si lega soltanto con cellule morte, poiché non riesce a passare la membrana, infatti si può usare per contare il numero di cellule morte ad esempio.
Ioduro di propidio (PI) è un colorante impermeant membrana che è escluso dalle cellule vitali
Il PI è un sospetto cancerogeno e deve essere maneggiato con cura.

Arancio di acridina (AO):
Assorbe a 465-495 nm, ed emette a 515-555 nm, verde, se legato al DNA, oppure assorbe a 528-553, ed emette a 600-660 nm, rosso, se legato ad RNA, o DNA a singola elica.
È un fluorocromo specifico per gli acidi nucleici (DNA/RNA), definito metacromatico, ossia con due diversi spettri di emissione.
Questa differente sensibilità degli acidi nucleici alla condensazione indotta dall'AO è la base della differente colorazione del DNA versus RNA.

Lectine:
Sono una famiglia di proteine che sono altamente specifiche per determinati zuccheri, svolgono un importante ruolo biologico nel processo di riconoscimento dei polisaccaridi presenti sulle membrane cellulari.
Specifiche lectine coniugate con un opportuno marcatore (perossidasi, metallo pesante, un fluorocromo) consentono la localizzazione delle glicoproteine di superficie in microscopia ottica, elettronica e a fluorescenza.

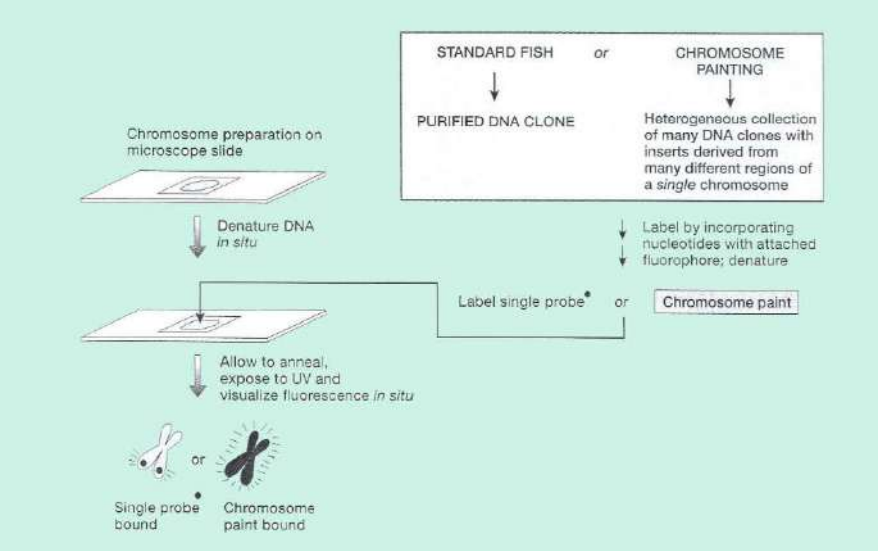
QUANTUM DOTS

Sono caratterizzati da un'emissione quasi monocromatica e dimensione-dipendente, ma al contrario dei fluorofori organici, l'assorbimento è continuo.

È possibile separare molto la lunghezza d'onda di eccitazione da quella di emissione ed eccitare simultaneamente QD con emissione diversa.
Questi sono una nuova classe di fluorocromi basati sulle nanotecnologie, i punti quantici, o QD, sono piccoli micro-cristalli di poco più grossi di una molecola d'acqua che, stimolati da un LED blu, possono emettere in modo stabile e preciso ogni colore visibile dello spettro.
Il pregio dei Quantum Dots è la possibilità di ottimizzarli in laboratorio, l'emissione infatti è proporzionale alla dimensione del cristallo stesso, e questo vuol dire che possiamo prendere dei Quantum Dots, illuminarli di blu e loro automaticamente emettono la luce del preciso colore che noi abbiamo stabilito.

FLUORESCENZA IN SITO DI IBRIDAZIONE (FISH)

Si mette il preparato sul vetrino e si denatura il DNA per far aprire la doppia elica.
Si usa una sonda uguale al pezzo di DNA che si vuole andare a cercare e la si mette con il DNA appena denaturato, e si rimette il tutto nelle condizioni di annealing, ovvero condizioni che fanno ri-appaiare le doppie eliche.
Si formeranno così doppie eliche di DNA, doppie eliche di sonde, e doppie eliche ibride di DNA-sonda.



Questa tecnica consente di visualizzare direttamente le alterazioni genetiche su nuclei in interfase e cromosomi in metafase.
La sonda di DNA è marcata con un composto fluorescente e ibridata su cellule immobilizzate su un vetrino da microscopio (in situ).
Il risultato si può osservare con l'uso di opportuni filtri al microscopio a fluorescenza.
La scelta delle sonde FISH da utilizzare dipende dal disegno sperimentale che si sta seguendo e il locus di interesse deve essere noto, possono infatti essere ottenute sonde locus specifiche.
La risoluzione dipende dalla dimensione della sonda a partire da >3Kb e dal DNA target utilizzato.
La FISH è una tecnica robusta e potente che consente di visualizzare delezioni, duplicazioni, ri-arrangiamenti, bilanciati e sbilanciati e di mappare i break-points.
Tuttavia richiede parecchio lavoro, poiché ogni locus deve necessariamente essere analizzato separatamente, e anche combinando fra loro diversi fluorocromi, il numero di loci che possono essere analizzati contemporaneamente è limitato.

APPLICAZIONI DELLA FISH

- Mappaggio di geni;
- Identificazione di anomalie strutturali dei cromosomi;
- Identificazione di cromosomi marcatori e di ri-arrangiamenti complessi in preparati metafasici da tumori;
- Identificazione di segmenti cromosomici omologhi in specie diverse;
- Analisi di aberrazioni cromosomiche.

MULTICOLOR BANDING

È una tecnica utilizzata in citogenetica molecolare per riconoscere le traslocazioni cromosomiche, ad esempio nelle trasformazioni neoplastiche.
I cromosomi vengono "verniciati" con specifiche sonde di DNA complementari alle sequenze di basi caratteristiche delle porzioni dei cromosomi da evidenziare.

Alle sonde sono per questo legate particolari molecole fluorescenti che emettono a determinate frequenze e che appaiono con diversi colori al microscopio.
Il computer elabora poi l'immagine evidenziando il bandeggio.
Risultano particolarmente suggestive le immagini realizzate con una tecnica di FISH-chromosome painting.

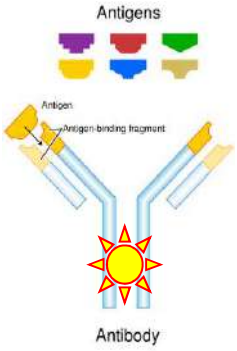
Tale tecnica può essere usata con sonde specifiche del cromosoma 21 su un campione di liquido amniotico, per vedere se è presente o meno la trisomia 21, mutazione molto grave che causa la sindrome di down.
Nel caso della trisomia 13 si ha la morte invece.

IMMUNOFLUORESCENZA

Si utilizzano i fluorocromi per evidenziare la reazione antigene-anticorpo, e possono essere di vario tipo.

IMMUNOCITOCHIMICA

Immunocitochimica diretta: gli anticorpi sono coniugati direttamente con coloranti fluorescenti.



Immunocitochimica indiretta: l'anticorpo riconosce un certo antigene e funziona a sua volta da parte antigenica, ovvero altri anticorpi segnati, secondari, riconoscono la parte costante di questo anticorpo, primario.
Più anticorpi secondari possono attaccarsi ad un unico anticorpo primario.
In genere si usa sempre questa tecnica indiretta.
Ad esempio se si hanno anticorpi di coniglio, e questi vengono iniettati in una capra, la capra produrrà degli anticorpi contro quelli del coniglio, i quali verranno marcati e sono detti anticorpi secondari anti-rabbit.

IMMUNOENZIMATICA

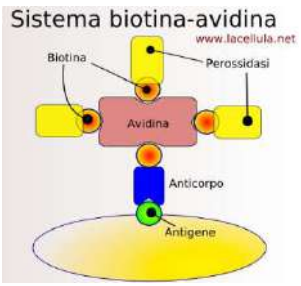
Prevede l'uso di enzimi legati direttamente o indirettamente all'anticorpo I per evidenziare la formazione del complesso antigene-anticorpo.
L'enzima catalizza la formazione di un precipitato colorato e insolubile visibile al microscopio, nel sito in cui è avvenuta la reazione antigene-anticorpo.

Enzima + Substrato = Prodotto colorato
(cromogeno)

Perossidasi (horseradish, enzima ottenuto dalle radici del rafano):
Immunocitochimica indiretta con anticorpi coniugati con perossidasi, enzima il cui substrato principale è il perossido di idrogeno.

La perossidasi è un enzima che catalizza l'ossidazione di un substrato rimuovendo due atomi di idrogeno che vengono a combinarsi con una molecola di acqua ossigenata.
Il substrato più utilizzato come cromogeno è la diaminobenzidina (dab), che normalmente è incolore, ma quando è ossidata è bruno-marrone.

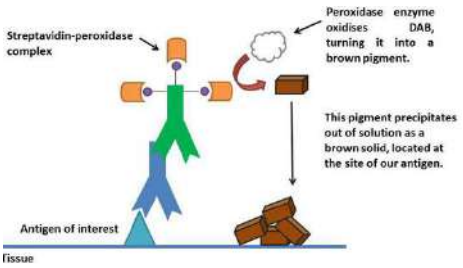
ABC, complesso Avidina-Biotina-Perossidasi:
Si basa sulla straordinaria affinità fra l'avidina, una glicoproteina tetramerica presente nell'albume d'uovo, e la biotina, vitamina H, che a sua volta è unita a perossidasi.
La biotina lega anche direttamente i gruppi aminici -NH_2 degli Ab, anticorpo biotinilato, e fa quindi da ponte tra l'anticorpo e l'avidina.



L'avidina ha 4 siti di legame: a 3 siti si lega la biotina complessata a fluorocromi o a molecole radioattive, mentre ad 1 sito si lega un anticorpo.
I vantaggi di tale tecnica sono:

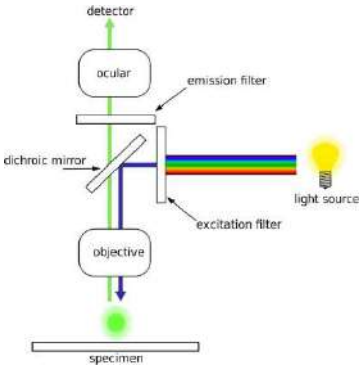
- alta affinità dell'avidina per la biotina;
- elevata amplificazione del segnale;
- l'avidina coniugata è molto stabile;
- basso costo e rapida.

Lo svantaggio è che la Biotina è endogena.



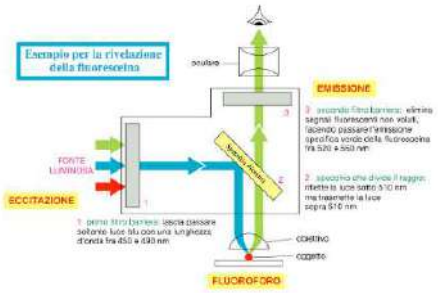
L'avidina non è la sola molecola capace di legarsi alla biotina, ma anche la streptavidina, ricavata da un batterio, si lega alla biotina e funziona anche meglio, ma in questo caso la streptavidina deve essere legata ad un fluoroforo, e quindi per vedere la reazione serve un microscopio a fluorescenza.

MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



Una sorgente di luce bianca, emissione intensa 200 w (luce e anche ultravioletto) e possibilità di usare filtri per cambiare la lunghezza d'onda.
Lo specchio dicroico è un filtro di vetro ricoperto da un sottilissimo film di alluminio (o fluoruro di calcio o fluoruro di magnesio).
Queste componenti consentono allo specchio di riflettere raggi con una certa lunghezza d'onda verso il campione, e di lasciar passare inalterati raggi con lunghezza d'onda maggiore emessi dal campione verso l'oculare.
In un microscopio a Fluorescenza possono essere utilizzati vari tipi di sorgenti per l'illuminazione, dalle classiche lampade al mercurio (HBO) o allo Xeno, alle più moderne al LED.

Un accorgimento è quello di illuminare il campione da sopra, con luce incidente, ciò minimizza la quantità di luce della lunghezza d'onda di eccitazione che viene 'sparata' verso l'oculare.
Questo tipo di microscopio viene definito ad epifluorescenza, il preparato è illuminato dal sopra da un fascio di luce che, deviato da un apposito specchio dicroico, attraversa l'obbiettivo.
Un filtro interposto tra la sorgente di luce ed il sistema ottico provvede a selezionare la lunghezza d'onda opportuna (ultravioletto) per eccitare la fluorescenza del preparato, questa è di lunghezza d'onda superiore a quella della luce di eccitazione, attraversa lo specchio dicroico senza esserne deviata e può raggiungere l'oculare per generare l'immagine.
Un filtro di barriera blocca l'ultravioletto residuo prima dell'oculare impedendogli di raggiungere l'occhio dell'osservatore.



Il segnale di fluorescenza è sempre sovrapposto ad una luminosità di fondo (background) che può avere origine sia da costituenti endogeni del campione biologico, autofluorescenza, sia esogeni, principalmente lo stesso fluoroforo non legato o legato in maniera non specifica.
Mentre quest'ultimo è sfortunatamente quasi impossibile da eliminare, l'autofluorescenza può essere minimizzata sia con opportuni filtri di sbarramento sia utilizzando sonde fluorescenti che assorbano ed emettano a lunghezze d'onda più alte possibile, l'autofluorescenza di cellule, tessuti e fluidi biologici è infatti massima per eccitazione nell'ultravioletto e minima ad eccitazioni superiori ai 500 nm.
Inoltre, a lunghezze d'onda maggiori, la diffusione della luce da parte dei mezzi densi come i tessuti biologici è molto ridotto, dal momento che dipende dall'inverso della quarta potenza della lunghezza d'onda.
Si può così ottenere una maggior penetrazione della luce di eccitazione nel preparato.

Microscopio a fluorescenza convenzionale:

Tutte le molecole di fluoroforo nel campione sono eccitate, anche quelle fuori dal piano focale, e poiché si sta eccitando tutto il campione la luce viene anche dagli altri piani focali, non solo dal piano di fuoco dell'obbiettivo.
Le aree sopra e sotto il piano focale d'interesse rendono meno distinguibili le strutture cellulari.
Questo porta ad un fenomeno noto come "bleaching" (bleach vuol dire candeggina, quindi si potrebbe tradurre "sbiancamento") che consiste nella perdita di fluorescenza del campione dopo che sta troppo tempo sotto la luce del microscopio, anche per questo i preparati fluorescenti vanno generalmente tenuti al buio.
Se poi il campione è vivo (es. una fettina di tessuto fresco) si possono avere fenomeni di fototossicità per cui le cellule vengono danneggiate da una continua esposizione alla radiazione eccitante, ad esempio per formazione di radicali liberi durante il processo di eccitazione/emissione dei fluorofori.
L'altro grosso problema è la luce che viene dagli altri piani focali, infatti la luce osservata non arriva necessariamente tutta dal piano focale che stai osservando, ma può arrivare anche da più sopra o da più sotto, e questo può far risultare le immagini poco nitide.

MICROSCOPIO CONFOCALE

Questo elimina gli effetti della sfocatura mediante la focalizzazione del raggio che illumina il preparato su un unico piano dell'immagine.
La microscopia confocale si avvale di una particolare configurazione ottica, che consiste essenzialmente nell'illuminare non tutto il campione, ma solo il piano focale che si sta osservando e nel raccogliere la luce solo dal medesimo.
Questo non è un microscopio a fluorescenza, ma spesso usato per visualizzare tali sostanze.
La differenza sta che nel microscopio ad epifluorescenza vedo un qualcosa che dall'alto è tridimensionale, mentre nel confocale ho una configurazione ottica tale che si illumina soltanto un piano focale per volta, e poi si vanno a fare varie sezioni a più livelli per poter ricostruire un'immagine tridimensionale, e ogni immagine in questo caso è ben definita, poiché sono raccolti soltanto i segnali messi a fuoco da ogni sezione.

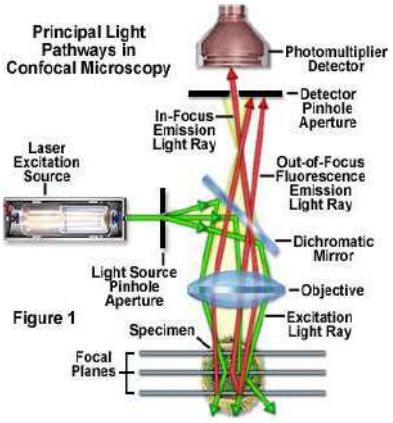


Figure 1

In questo caso la sorgente luminosa è un laser che emette una lunghezza d'onda fissa, quindi non c'è bisogno di filtri di eccitazione.
Lo specchio dicroico fa passare la luce e l'obiettivo la focalizza sul campione, il campione viene nuovamente eccitato ed emette luce sul piano focale e da altri piani.
La luce torna allo specchio dicroico, viene fatta passare e poi passa da un "pinhole", un forellino molto piccolo che fa passare solo la luce dal piano focale.
La luce dal piano focale arriva al detector che serve per amplificare il segnale.
L'area intorno incorre nel photobleaching e ciò può provocare deterioramento delle sonde fluorescenti.
Tale fenomeno è stato risolto con la microscopia confocale a due fotoni.

Il microscopio a scansione laser a due fotoni:
Il problema della microscopia in fluorescenza è il photobleaching cioè lo spegnimento delle sonde fluorescenti, esse, infatti, possono emettere solo un numero limitato di fotoni e, quindi, se eccitate per troppo tempo, si "spengono".
Questo problema riguarda anche il microscopio confocale a scansione laser, dove per scandire un singolo punto sul piano a fuoco, si illumina il campione con un fascio che disegna in esso un doppio cono di illuminazione simile ad una clessidra, e tutta questa zona è inutilmente illuminata perché genera informazioni che il confocale tenterà ad eliminare con l'ausilio del pinhole di uscita.
Se durante il sezionamento, il campione diminuisce di intensità, si ha una drastica alterazione dell'acquisizione, se non addirittura la perdita completa delle ultime parti scansionate, a causa del deterioramento totale delle sonde fluorescenti, per risolvere tale problema è stata elaborato un nuovo tipo di microscopia, la microscopia a due fotoni.

Questo tipo di microscopia si basa sul principio che se un atomo riceve un fotone di energia E, esso si porta in uno stato eccitato, ma se riceve contemporaneamente due fotoni (di più bassa energia ma con somma E) esso si porta ugualmente nello stato eccitato, come se avesse "sentito" un unico fotone più energetico.

Microscopia confocale a due fotoni:
Due fotoni a più bassa energia possono interagire con gli atomi di una molecola come se fossero un unico fotone ad un'energia più alta, ciò avviene però solo se i due fotoni vengono forniti in rapida successione temporale (sec^{-15}).
Si utilizza un laser infrarosso che emette cicli di impulsi ultracorti a lunghezza d'onda di emissione variabile.
Tale strumento è molto costoso.
Come risultato si ottiene:

- un ridotto danneggiamento del preparato, perché la luce infrarossa ha meno energia;
- una notevole riduzione del photobleaching, che si verifica solo nel piano focale.

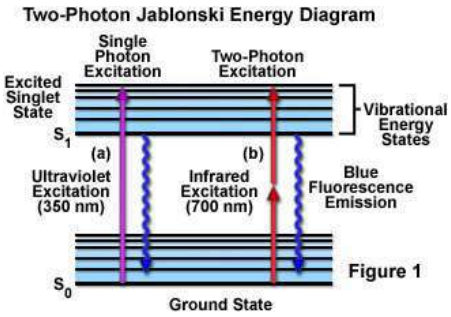


Figure 1

Nella microscopia di eccitazione multiphoton, i coloranti fluorescenti eccitati assorbono l'energia di due fotoni contemporaneamente, e sono quindi eccitati al doppio della lunghezza d'onda utilizzata in osservazioni a fluorescenza ordinarie, poiché l'energia del fotone è inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda.
Poiché l'eccitazione del colorante fluorescente in questa eccitazione multiphoton è proporzionale al quadrato dell'intensità della luce di eccitazione, solo la zona prossimale al punto focale, dove la densità di fotoni è elevata, può essere eccitata.
Con tale tecnica si può vedere un emissione a tempo più lungo di quella con un microscopio a singolo fotone.

BIOLUMINESCENZA

Nel mondo naturale esistono geni che codificano proteine che sono spontaneamente fluorescenti, ad esempio nel mare molte specie possiedono caratteristiche di luminescenza, e anche in alcuni batteri si può osservare tale capacità di illuminare intensamente.
Un esempio di ciò sono le alghe unicellulari della specie Dinoflagellati, che in grande quantità sono responsabili di meravigliosi episodi di bioluminescenza nella Biobay dell'Isola Vieques, vicina a Porto Rico, qui l'acqua di mare mossa nell'oscurità della notte si accende di una vivida luce azzurrina.
Ci sono anche degli adattamenti nel mondo vegetale, come in alcune piante carnivore, che sono però visibili solo agli insetti.

La bioluminescenza è un fenomeno per cui organismi viventi emettono luce attraverso particolari reazioni chimiche, nel corso delle quali l'energia chimica viene convertita in energia luminosa, ovvero è la produzione di luce operata da foto-proteine presenti in alcuni organismi grazie alla presenza di sistemi enzimatici

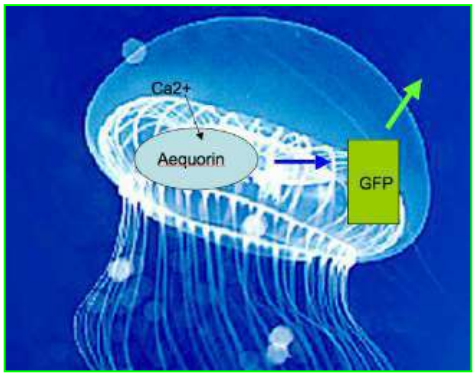
GENI REPORTER

Quando si introduce DNA estraneo nelle cellule è necessario visualizzare le cellule modificate geneticamente, e per fare ciò vengono usati questi geni.
Tali geni devono rispettare delle caratteristiche:

- non devono essere presenti nell'organismo studiato;
- vengono utilizzati privi del proprio promotore;
- devono essere facilmente identificabili;
- non devono interferire con le normali attività cellulari.

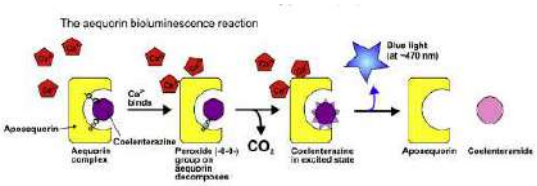
GFP, GREEN FLOURESCEN PROTEIN

Questa proteina fu trovata in una medusa, dove un'altra proteina, l'aequorina, in determinate condizioni si lega al calcio ed emette luce blu, tale luce blu eccita la GFP che emette una luce a fluorescenza verde, quindi la medusa nell'insieme emette una luce blu-verdastra.



Proteine bioluminescenti:

- Equorina (199 aa - 22 KDa): la proteina ha tre siti di legame per il Ca^{2+}, e quando il calcio occupa questi siti il complesso, in presenza di O_2, subisce cambiamenti conformazionali



È una piccola proteina composta da due distinte unità: l'apoequorina (21 kDa) e da un cofattore, un gruppo prostetico, la celenterazina.
La celenterazina emette luce a seguito di un'ossidazione Ca^{2+} dipendente, e non si rigenera.
La reazione è catalizzata dall' enzima equorina

Gruppo prostetico= cofattore non proteico, quando è legato in modo stabile alla proteina inattiva la rende attiva.

In questo caso si utilizza come indicatore di Ca^{2+} intracellulare, e la luminescenza flash associata all'equorina in presenza di calcio è utilizzata come marker sensibile per la rilevazione di bassissime concentrazioni di calcio.

Per produrre 125 mg di proteina purificata servirebbero però due tonnellate di meduse, si usa quindi equorina con il metodo del DNA ricombinante da E. coli e la ricostituzione del complesso in vitro con celenterazina sintetica.

Questa proteina è molto usata poiché non è tossica e non interferisce con le funzioni cellulari, ed è possibile quindi usarla in vivo.
Un esempio di tale utilizzo si ha nell'iniezione di equorina nell'uovo, la quale permette di visualizzare nella cellula uovo di un pesce l'onda di rilascio del Ca^{++} in seguito alla fecondazione, cioè l'attivazione dell'uovo.
L'attivazione della cellula uovo consiste in una serie di eventi successivi alla fecondazione che hanno lo scopo di preparare la cellula stessa a iniziare la sua attività di zigote e quindi di embrione.
In generale l'attivazione prevede il blocco della polispermia, la preparazione alla fusione dei due pronuclei e l'inizio della traduzione degli mRNA materni e della trascrizione dei geni zigotici.
Tra questi, il processo più repentino e immediatamente visibile è il blocco della polispermia, specialmente nelle uova del riccio di mare e dei pesci, che sono, peraltro, le più studiate nell'ambito della fecondazione.
Il blocco della polispermia avviene attraverso il processo di innalzamento della membrana di fecondazione a seguito dell'esocitosi degli alveoli corticali, che crea una sorta di camera a dividere la membrana della cellula uovo dagli altri spermatozoi, l'innalzamento avviene a seguito dell'ingresso del primo spermatozoo, inizia proprio nel punto del suo ingresso e si espande velocemente a tutta la superficie della cellula.
Quindi, è questo processo che viene utilizzato come indicatore dell'avvenuta attivazione dell'uovo.

- Fura 2: colorante fluorescente sensibile alle concentrazioni di Ca^{++} citosolico, un indicatore sintetico permeabile alle cellule.
  Questo è eccitato a 340 nm e 380 nm di luce UV, e il rapporto delle emissioni a quelle lunghezze d'onda è direttamente correlato alla quantità di calcio intracellulare, e si ha:
  - una colorazione blu se la concentrazione di Ca^{++} è bassa;
  - una colorazione rossa se la concentrazione di Ca^{++} è alta.

  Fura-2 è un acido carbossilico poliaminoacido, è un colorante fluorescente che si lega a calcio libero intracellulare.
  Era il primo colorante diffuso per l'imaging del calcio, e rimane molto popolare.

In vivo l'equorina attivata provoca modificazioni chimiche post-traduzionali, come ciclizzazione, disidratazione od ossidazione della proteina GFP, che formano il cromoforo entro 1 ora dalla sua produzione.

Questa è una proteina molto piccola, 27 kDa, ed ha una struttura a barilotto formata da 11 foglietti beta, e solamente tre amminoacidi (Ser65, Tyr66, Gly67) formano il cromoforo che sta al centro del barilotto, ben protetto da modificazioni ambientali.
La GFP nativa matura è infatti stabile alle variazioni di salinità, pH, temperatura.

La caratteristica fluorescenza della GFP può essere riprodotta anche in organismi diversi
È stato preso il gene dalla medusa, clonato e sequenziato, ed ora la sua funzione va dai batteri ai mammiferi.
Le molte varianti hanno fornito un ampio spettro di molecole capaci di emettere luce di altri colori, queste sono molecole in cui è stato modificato il cromoforo.

La luminescenza di GFP è un fenomeno intrinseco alla stessa proteina e non richiede substrati né enzimi.
Questa è un buon marcatore screenable per:

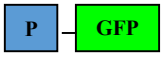
- identificare organismi transgenici;
- localizzazione e regolazione dell'espressione genica;
- il movimento delle cellule;
- il destino delle cellule durante lo sviluppo embrionale e la formazione di organi diversi.

La GFP come tracciante:
È possibile utilizzarla per l'identificazione e la localizzazione subcellulare delle proteine in vivo.
La sequenza nucleotidica della proteina X interessata viene fusa in frame con la sequenza nucleotidica di GFP, un gene di fusione è quindi formato dai due geni.
Si rimuove lo stop codon dalla sequenza di DNA che codifica la prima proteina, poi si aggiunge in frame la sequenza di DNA che codifica la seconda proteina.
Viene effettuata la PCR, e si effettua una ligation con il prodotto di PCR e il vettore target.
A questo punto si trasforma il prodotto della ligation dentro cellule batteriche competenti e viene così espresso il gene di fusione come una proteina unica.
Ciò può essere fatto sia in batteri che in cellule eucariotiche.

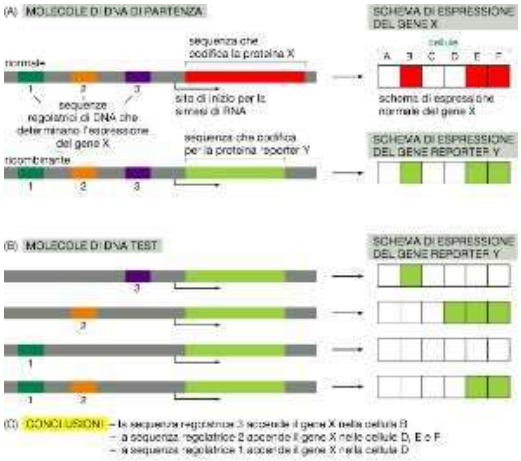
COSTRUTTI DI FUSIONE

Funzionalità di un gene: fusione del gene d'interesse con il gene reporter, entrambi posti sotto la regolazione dello stesso promotore;

Funzionalità di un promotore: gene reporter posto sotto il controllo di quel promotore, così il promotore controlla l'espressione del gene x, e non sapendolo anche quella del reporter, ottengo così l'espressione di entrambi.

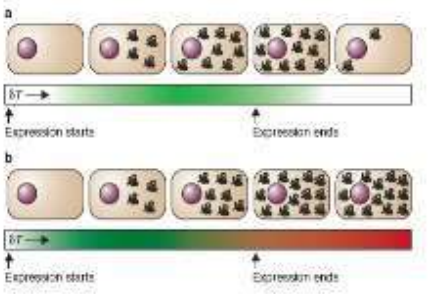


Anatomia del promotore:
I promotori hanno una serie di domini diversi.
In questo esempio la proteina x e il gene reporter si esprimeranno quando questo promotore è wild tipe nella cellula B E F.



Per sape quale regione è importante, si provano ad eliminare le prime 2 regioni, e grazie al gene reporter si vede che si accende solo il gene B, quindi quelle due erano importa per fa esprime i geni E ed F.
Se si provano ad eliminare le regioni 1 e 3 si vede che invece si esprimono i geni in D E F.
Quindi dai risultati in cui si esprimono i vari geni reporter posso dissezionare funzionalmente questo promotore.

Si possono adoperare due approcci per il monitoraggio delle cinetiche di espressione genica utilizzando proteine fluorescenti:



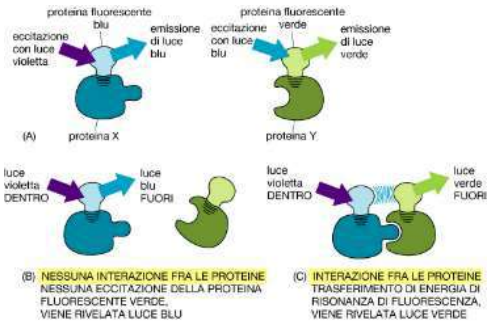
a. destabilizzando la proteina fluorescente, questa una volta destabilizzata viene degradata e non si ha più la sua espressione;
b. proteina fluorescente a timer, ovvero utilizzando le proprietà spettrali del cambiamento della proteina fluorescente nel tempo.
   Ad esempio una proteina fluorescente inizialmente può dare una colorazione verde, poi man mano che trascorre il tempo tale colorazione può tendere al rosso, tale cambiamento sta ad indicare l'età della proteina.
   Tale cambiamento di colore è dovuto ad un cambiamento conformazionale a cui la proteina va incontro man mano che degenera.

Un punto fermo è che la GFP si esprime sempre ma non ci dà alcuna informazione del tempo di espressione della proteina.
Sono state fatte quindi delle varianti di GFP che variano nel tempo e che si destabilizzano, queste si esprimono quando il promotore esprime la proteina, ma se dopo un po' non ne viene prodotta un'altra, la prima ad essere stata espressa si spenge.
Questa variante ci dà quindi un'idea della distanza temporale tra un determinato prodotto proteico e la sua successiva riproduzione.

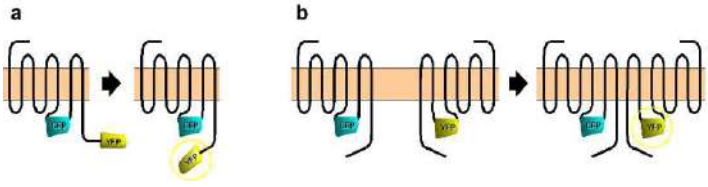
Dalla sua introduzione in organismi eterologhi come marker di espressione genica, la GFP ha portato una rivoluzione drammatica nella cellula, nello sviluppo e nella neurobiologia, consentendo la visualizzazione delle proteine di fusione fluorescenti che si muovono all'interno e tra le cellule.

LA TECNICA FRET (TRASFERIMENTO DELL'ENERGIA DI RISONANZA)

Come già detto, la GFP, e le molecole da essa derivate, può essere fusa con la proteina da monitorare al fine di identificare interazioni fra proteine.
Questa proteina si può usare anche negli organi/cellule fissate, tramite anticorpi, ma si utili anche in vitro per una tecnica che si chiama FRET.
Se abbiamo che una proteina x è fusa insieme con GFP, e questo complesso irradiata a UV emette luce blu, l'emissione di blu può servire da eccitatore per mette in evidenza la prese di una protei y messa in evidenza da GFP che questa volta emette fluorescenza verde.



L'emissione di una protei di fusione può servire da luce di eccitazione per un'altra proteina di fusione per vede se delle proteine interagiscono tra loro, poiché per eccitarla vuol dire che le due proteine sono vicine tra loro.
Se si osserva solo luce blu, vuol dire che le due proteine sono lontane e quindi non interagiscono tra loro, se invece si osserva una luce giallo-verdastra, allora le proteine sono vicine, circa 10-15 nm, e vuol dire che interagiscono tra loro, perché c'è un trasferimento dell'energia di risonanza.
La FRET permette di monitorare le variazioni conformazionali all'interno della singola proteina (a) o le interazioni tra proteine diverse (b), ad esempio recettori di membrana.
Per monitorare i cambiamenti conformazionali all'interno della macromolecola, ad esempio, è possibile marcarla in due siti differenti, lontani tra loro più di 10 nm: se la proteina cambia conformazione, avvicinando i due siti, la FRET può avere luogo ed è in grado di dare segnale.
Se il cambiamento conformazionale, invece, è dovuto all'interazione con un ligando, è possibile posizionare uno dei due fluorofori direttamente sul ligando.



Nel caso della figura (a), è visibile un esempio di cambiamento conformazionale, che avvicina i due fluorofori. In questo caso, la FRET avviene e l'operatore individua un segnale eccitando il donatore e rilevando fluorescenza al picco dello spettro dell'accettore.
Nella sezione (b) della figura è rappresentato un approccio FRET per lo studio delle interazioni tra due proteine, la prima è associata a BFP, un donatore, la seconda a YFP, un accettore.
Se le due proteine non sono tra loro associate, non è rilevabile alcun segnale FRET, mentre se le due proteine sono associate, l'operatore individuerà un segnale FRET al picco di emissione di YFP.

SELEZIONE DEI RICOMBINANTI PER PRESENZA O ASSENZA DI β-GALATTOSIDASI LAC-Z

Il gene z dell'operone lac, anche detto Lac-Z, codifica per la β-galattosidasi, e in presenza di IPTG che funziona da induttore la β-GAL può degradare un analogo del lattosio, X GAL.

Si possono usare whole mount o sezioni al criostato, che vengono colorate per la β-GAL (X-GAL), e le regioni che sono β-GAL positive si colorano di blu, e in genere poi viene usato uno sfondo con un colore di contrasto.
La β-galattosidasi catalizza l'idrolisi di X-GAL, che produce un colore blu in cellule esprimenti il gene trasfettato.

La consegna dei geni reporter in cellule è diventato il mezzo principale attraverso cui i ricercatori studiano la funzione del gene e la regolazione dell'espressione genica.
Lac-Z è un gene reporter comunemente utilizzato in esperimenti di trasfezione perché il prodotto genico, β-galattosidasi, è molto stabile e resistente alla degradazione proteolitica e facilmente dosabile.
Il kit β-galattosidasi per la colorazione fornisce un metodo facile da usare ed efficiente per determinare l'efficienza di transfezione ed espressione di Lac-Z genica.
Ogni kit fornisce una quantità sufficiente per eseguire fino a 75 test in 35 mm piatti.

Componenti del kit:

1) 100X di fissaggio Solution (Codice 90010): Un tubo - 1,5 ml di 25% glutaraldeide;
2) La colorazione Soluzione A (Codice 90011): Un tubo - 1,5 ml di 500 mm di potassio Ferrocianuro;
3) La colorazione Soluzione B (Codice 90012): Un tubo - 1,5 ml di 500 mm di potassio ferricianuro;
4) La colorazione Soluzione C (Codice 90013): Un tubo - 1,5 ml di 200 mm MgCl2;
5) X-gal Solution (Parte N. 90014): Tre tubi - 1,5 ml di 40 mg / mL X-gal in DMF per ogni tubo.

Il gene Lac-Z si può inserire in frame e utilizzato come reporter con una altro gene, in modo che si esprima quando si esprime il gene.
Si può vedere la sua espressione con la colorazione con X-GAL, si ha una selezione bianco-blu della trasfezione dei batteri, si ha colorazione blu in assenza dell'inserto nei batte, mentre si ha bianca se è presente l'inserto.
È meno utilizzabile della GFP però, perché per evidenziarla serve fare fissazione e taglia delle sezioni, quindi non sono più strutture viventi, altrimenti non si riuscirebbe a vedere nulla perché non è auto-fluorescente.
Si può però utilizzare anche in cellule in coltura, fondendo il gene x di cellule con Lac-Z, e sempre tramite X-GAL saranno blu se questo è presente, altrimenti no.
Se non ci fosse a disposizione questo kit per visualizzare il gene messo in evidenza con questo reporter, si potrebbe usare un anticorpo contro quella specifica proteina, o con un ibridazione in situ con RNA-antisenso per mettere in evidenza la presenza del messaggero, o la presenza della proteina con immunoglobuline.

GUS, β-GLUCURONIDASI

È un gene simile alla β-galattosidasi, usato come reporter nelle piante perché presentano livelli irrilevanti di questo enzima, che catalizza la degradazione di carboidrati complessi, al contrario dei vertebrati e dei loro microorganismi.
Quando le cellule vegetali trasfettate vengono incubate con X-GLUC, simile ad X-GAL, si forma un substrato azzurro.

Nei vertebrati questo enzima catalizza il distacco di unità di acido glucuronico dalle molecole dei glicosaminoglicani, il suo deficit è responsabile di patologie come mucopolisaccaridosi, la mucolipidosi VIII, in cui si accumula eparansolfato.

Utilizzo del gene reporter GUS, β-glucuronidasi, nell'analisi dei promotori:
Sappiamo che un gene X, rol-B, si esprime a livello di meristema apicale, e facciamo l'ipotesi di aver identificato una sequenza GAAT del promotore che dirige l'espressione di questo gene specificamente nei meristemi apicali.
Per dimostrarlo modifichiamo in vitro la sequenza bersaglio e la leghiamo, in vari costrutti, al gene che codifica GUS.
I costrutti vengono trasferiti in una pianta superiore e le relative piante transgeniche vengono analizzate istochimicamente.
Il promotore, rol-B, mutato (M1), non è più in grado di riconoscere la sequenza bersaglio e, quindi, non si ha espressione di GUS nei meristemi apicali, confermando l'importanza funzionale della sequenza in esame.
Anche questo reporter si può usare quindi per analizzare i promotori, si mette sotto il controllo di un promotore di un gene specifico il gene GUS, se si muta il promotore, si può vedere che in una pianta con questa mutazione non ho colorazione azzurra, ma ce l'ho nel controllo con il promotore non muta.

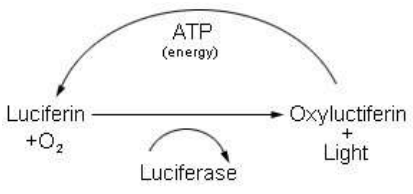
β-galattosidasi (GAL) o β-glucuronidasi (GUS):
Questi enzimi provocano la colorazione delle cellule che lo esprimono quando esse si trovano in un terreno contenente X-GAL (X-GLUC) che idrolizzato genera un prodotto di colore blu.
Sono enzimi stabili, la cui attività permane a lungo nelle cellule che li esprimono, ma qualora si volessero osservare rapidi cambiamenti nell'espressione genica tali reporter non potrebbero essere utilizzati.
La β-galattosidasi è un enzima idrolitico che catalizza l'idrolisi dei residui terminali di β-D-galattosio nei polisaccaridi noti come β-galattosidi, tramite la rottura dei legami β-glicosidici terminali, questo enzima provoca la colorazione delle cellule che lo esprimono quando esse si trovano in un terreno contenente X-GAL.

LUC, GENE PER LA LUCIFERASI COME REPORTER

Luciferasi è un nome generico dato ad enzimi coinvolti in processi di bioluminescenza, e che catalizzano l'ossidazione della luciferina, un pigmento capace di emettere luce quando ossidato.
I geni che producono queste molecole possono essere trasferiti in numerosi organismi e usati come reporter.
Le luciferine sono una classe di composti eterociclici che emettono luce, e sono presenti in diversi organismi in cui si osserva bioluminescenza.
Luciferasi e l'imaging di bioluminescenza offrono un vantaggio significativo, in quanto a differenza di imaging di fluorescenza:

1) non richiedono una sorgente di eccitazione esterna per produrre luce;
2) tessuti animali non emettono quantità significative di luce.

Firefly luciferasi è l'enzima più popolare, seguito da Renilla luciferasi, Gaussia luciferasi, Metridia luciferasi, Clickbeetle luciferasi e luciferasi batterica.
La bioluminescenza è una forma naturale di chemiluminescenza in cui l'energia viene rilasciata da una reazione chimica in forma di emissione di luce.
Nelle reazioni luminescenti, luce è prodotta mediante ossidazione di un luciferina, a ricco pigmento chimico energia, questa reazione è catalizzata quando l'enzima luciferasi agisce sul substrato luciferina appropriata, e sono reazioni che utilizzano ATP.
È una reazione fortemente energeticamente efficiente: quasi tutta l'energia immessa nella reazione viene trasformata in chiaro, resa quantica del 88% per lucciola luciferasi ad esempio.



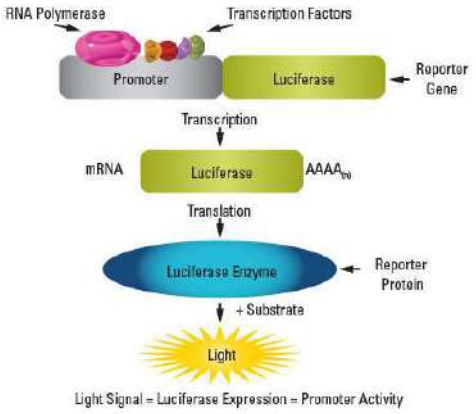
Questi sono enzimi che restano attivi per un po' di tempo, si utilizzano per osservare dei rapidi cambiamenti nell'espressione genica.
Riepilogando: quasi tutta l'energia chimica apportata ad essa viene convertita in energia luminosa, e la quantità di luce prodotta da questa reazione enzimatica è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente nel campione.

La luciferasi ha guadagnato popolarità enorme nei sistemi biologici di studio, perché la bioluminescenza è sensibile a reagenti facili da usare.
Esempi di aree in cui la bioluminescenza viene utilizzata di routine comprendono:

- imaging in vivo;
- la vitalità cellulare/saggi di proliferazione;
- proteine pieghevole/secrezione di analisi;
- saggi di gene reporter.

L'imaging in vivo è un metodo non invasivo che sta guadagnando l'accettazione rapida nella ricerca biomedica a causa della possibilità di monitorare eventi molecolari negli animali vivi quali topi e ratti.
Nei modelli animali di malattia, le cellule, gli agenti patogeni, proteine o altre molecole sono marcati con luciferasi bioluminescenti e visualizzate dopo l'aggiunta localizzata o sistemica di substrato.
Questa bioluminescenza emessa dal profondo di un animale sperimentale può essere rilevata con un sistema di rivelazione sensibile.
Dei saggi bioluminescenti sono stati sviluppati per monitorare la vitalità cellulare e la proliferazione, tramite la quantificazione dell'ATP libera nelle cellule metabolicamente attive che utilizzano luciferasi ATP-dipendenti.
Come una popolazione cellulare prolifera, aumenta la quantità di ATP disponibile, con un conseguente aumento concomitante nel segnale bioluminescente della popolazione.

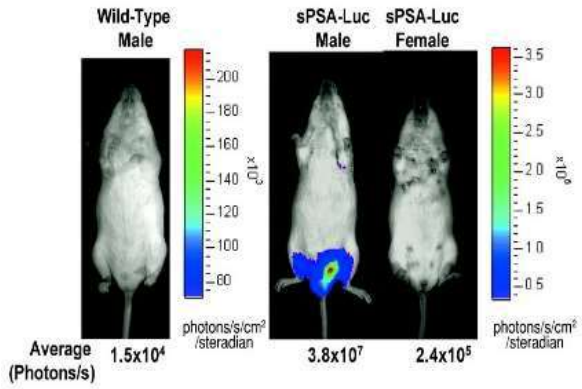
Dei saggi di gene reporter sono stati fatti per indagare gli elementi regolatori genetici che controllano l'espressione dei geni.
L'enzima prodotto dal gene per la luciferasi, 36 o 61 kDa, agisce sulla luciferina, che è il substrato che perde energia, cioè elettroni, sotto forma di radiazione luminosa.
Tale reazione ha un'altissima sensibilità e ha un rapido decadimento.
Ci sono una serie di applicazioni sperimentali diverse.
Se voglio sapere se un promotore è attivo, di un determinato gene, si mette la luciferasi, e se questa emette luce vuol dire che il promotore era attivo.
La luciferasi è molto sensibile e decade velocemente, è adatta come reporter perché è piuttosto piccola e non interferisce con le reazioni dell'organismo.



L'emissione di luce è molto intensa ma molto breve, quindi i controlli vanno fatti in tempo reale.

Principio di un saggio luciferasi tempo reale:
Il vettore plasmide reporter è costituito dalla sequenza del promotore di destinazione e la sequenza del gene della luciferasi.
Dopo la trasfezione del plasmide in cellule bersaglio, la regione del promotore regola l'espressione del gene della luciferasi in cellule viventi.
Per il saggio luciferasi tempo reale, la lucciola luciferina nel mezzo entra nella luciferasi vivente espressa dalle cellule, ed è ossidata a luciferasi immediatamente, con conseguente produzione di luce.
La quantità di proteine luciferasi espresso può essere definita dall'intensità della luce, tale intensità indica l'attività del promotore nelle cellule viventi.
Il monitoraggio deve esse fatto in tempo reale e si fa tramite degli strumenti detti luminometri, strumenti che funzionano al buio.

MODELLO DI TOPO TRANSGENICO LUCIFERASI: Visualizzazione dello sviluppo della prostata di animali vivi



I topi sono stati anestetizzati e successivamente hanno ricevuto un'iniezione di luciferina.
La luciferina entra nelle cellule dal sangue, ed è catalizzata dove la luciferasi è espressa, generando luce.
Gli animali sono collocati in una camera a tenuta di luce e ripresi con una telecamera.
Le immagini sono state acquisite 25 minuti dopo la somministrazione di luciferina.
L'intensità di segnale può essere quantificata, in questo caso, la bioluminescenza è misurata mediante apparecchiature speciali.
Si vuole analizza un promotore che si attiva e esprime il gene fondamenta per la formazione per la prostata.
Si mette la luciferase sotto tale promotore e si segue lo sviluppo della prostata in questi animali in vivo.
La prostata si sviluppa, e questi animali riceveranno un'iniezione di luciferina, si vedrà quindi la generazione di un lampo di luce, ma per vederlo i topi devono essere in un luminometro al buio.
Si vedrà il lampo solo nei topi maschi modificati portanti il gene reporter luciferase.
Per controllo si inietta luciferina anche nella femmina, e non dovrebbe esserci l'emissione della luce, in questo caso si parla di controllo negativo.
Altra possibilità è che ci sia qualche reazione della luciferase in topi wild tipe.

PRODUZIONE DI PROTEINE PER MEZZO DELL' INGEGNERIA GENETICA

Proteine, equivalenti alle proteine naturali o varianti, ottenute in seguito a trascrizione e traduzione di DNA ricombinante.
Queste possono servire nella ricerca di base, per studiare la funzione e le proprietà di una proteina.
Alcune applicazioni pratiche sono:

- proteine di interesse terapeutico (biofarmaci);
- proteine di interesse commerciale (enzimi);
- proteine da utilizzare come antigeni per la produzione di anticorpi policlonali e monoclonali.

Produzione di biofarmaci:
La produzione delle proteine terapeutiche in microorganismi non è sempre possibile soprattutto per le modificazioni post-traduzionali.
L'utilizzo di cellule animali consente di ottenere prodotti proteici strutturalmente più simili al prodotto fisiologico, ma pone difficoltà tecniche e costi più elevati.
I vantaggi di questi rispetto a sistemi procariotici sono il folding corretto, il taglio proteolitico da precursore, la glicosilazione e la modificazione di amminoacidi (fosforilazione, acetilazione, ecc.).
L'esempio piè eclatante in questo campo è l'insulina.

Alcuni obiettivi di interesse biotecnologico sono:

- Riuscire a produrre nuove proteine di interesse medico o industriale;
- Massimizzare la produzione di proteine ricombinanti;
- Facilitare i processi di purificazione delle proteine;
- Costruire proteine diverse da quelle presenti in natura, dotate di nuove e vantaggiose proprietà;
- Proteine di I generazione identiche alle proteine endogene umane;
- Proteine di II generazione modificate al fine di:
    - Migliorarne le caratteristiche farmacocinetiche (diminuire la biodegradabilità, aumentare la penetrazione cellulare, ecc);
    - Generare prodotti inattivi con funzioni diverse da quelle originarie;
    - Generare dei prodotti più stabili facilitandone la conservazione.

PROTEINE RICOMBINANTI

Per ottenere proteine ricombinanti occorre clonare il gene in 'vettori di espressione', che posseggono una cassetta di espressione, in cui deve esserci un sito in cui clonare.
Si deve poi inserire il vettore all'interno del sistema cellulare prescelto, la scelta di tale sistema dipende dal tipo di proteina ricombinante che si vuole ottenere.
Le proteine ricombinanti ottenute dovranno poi essere individuate e purificate.
C'è un mercato notevole dietro ciò, poiché hanno abbassato di molto i costi.

Produzione di proteine terapeutiche, scelta del vettore:

- Proteine poco complesse:
  - BATTERI:
    - Ancora il più usato;
    - Ottimizzazione;
    - Problemi: recovery delle proteine, poche modificazioni post-traduzionali;
  - PIANTE:
    - Utilizzo in lenta crescita;
    - Codice regolatorio per espressione;
    - No modificazioni post-traduzionali;
    - Grandi volumi possibili.
- Proteine complesse:
  - CELLULE ANIMALI:
    - Alti livelli di espressione e modificazioni;
    - Costi elevatissimi per set-up e tempi lunghi per FDA approval;
  - ANIMALI TRANSGENICI:
    - Alti livelli di Espressione di proteine anche molto complesse;
    - Costi bassi;
    - Riproducibilità della produzione.

La scelta del vettore dipende quindi ampiamente dall'ospite, una volta che l'ospite è stato selezionato, molti vettori diversi sono disponibili.

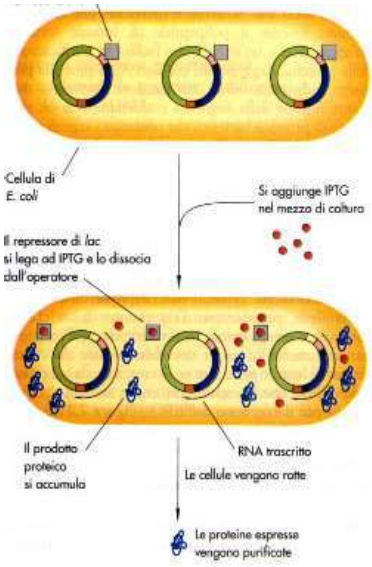
Scelta dell'ospite:
La scelta dell'ospite è correlata, oltre che alla necessità di avere modificazioni post-traduzionali, anche con il modo in cui il prodotto può essere successivamente purificato.
Dei costrutti spesso consentono la secrezione della proteina, questo elimina la necessità di lisi cellulare, che richiede metodi più potenti per lievito che per E. coli.
I lieviti danno una glicosilazione più estesa di cellule di insetto e cellule di mammifero, questo è un inconveniente di espressione in lievito, inoltre i lieviti mancano di alcune funzioni di modificazioni post-traduzionali che esistono in eucarioti superiori.
I batteri producono spesso dei corpi di inclusione che rende difficoltoso l'estrazione della proteina.

Scelta del vettore:
Alcuni vettori, denominati vettori di espressione, possono produrre il prodotto proteico dei geni clonati.
Il DNA è inserito sotto il controllo del promotore Lac, che si trova a monte del sito multiplo di clonaggio.
Se un DNA inserito si trova nella stessa fase di lettura del gene Lac-Z che interrompe, si avrà una proteina di fusione, la quale avrà una sequenza parziale della proteina β-galattosidasi all'estremità N-terminale e un'altra sequenza proteica, codificata dal DNA inserito, all'estremità C-terminale.

Tuttavia se si vuole ottenere un'elevata espressione di un gene clonato, si rende necessario utilizzare vettori di espressione specializzati che solitamente funzionano meglio.
I vettori di espressione batterici, tipicamente possiedono due elementi necessari per l'espressione genica: un promotore forte, in quanto tanto più mRNA viene prodotto tanto più prodotto proteico verrà sintetizzato, e un sito di legame per i ribosomi vicino a un codone di inizio ATG.
Di solito è vantaggioso mantenere il gene clonato represso fino al momento in cui deve essere espresso, poiché le proteine eucariotiche prodotte in grandi quantità possono risultare tossiche per i batteri.
Anche se queste proteine non sono tossiche per sé, possono accumularsi fino a raggiungere livelli tali da interferire con la crescita delle cellule batteriche, pertanto è conveniente tenere il gene clonato inattivo ponendolo a valle di un promotore inducibile che può essere inattivato.

Il promotore lac è in una certa misura inducibile, rimanendo presumibilmente inattivo fino a che stimolato dall'induttore sintetico isopropiltiogalattoside (IPTG).
Comunque, la maggior parte dei vettori di espressione produce proteine di fusione, a prima vista questo potrebbe sembrare svantaggioso in quanto non viene sintetizzato il prodotto naturale del gene trascritto. Tuttavia, gli amminoacidi in eccesso presenti nella proteina di fusione possono essere di grande aiuto nella purificazione della proteina stessa, in quanto si può agire su variazioni di pH, temperatura etc, come con tutte le altre proteine.

Regolazione dei vettori di espressione:
L'espressione di una proteina eterologa tende ad essere identificata come "estranea" e degradata dalla cellula che attiva specifiche proteasi.
La possibilità di indurre l'espressione della proteina permette di minimizzare le degradazioni proteolitiche aumentando le rese, alcune proteine possono essere tossiche o, comunque, interferire con la crescita dell'ospite di espressione.
In alcuni casi fino al 50% delle proteine totali sono costituite dalla proteina ricombinante, a discapito delle proteine che assicurano il normale metabolismo di E. coli.



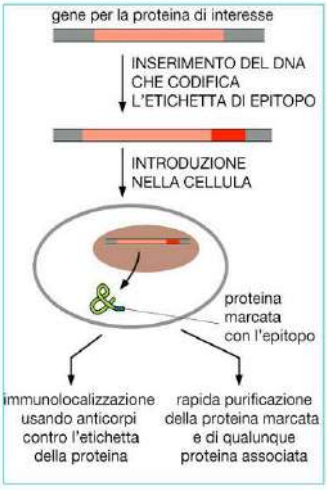
La possibilità di limitare l'espressione della proteina alla sola fase di induzione permette il normale sviluppo della cellula, la possibilità, di indurre sperimentalmente l'espressione della proteina rappresenta, inoltre, un primo strumento di verifica dei livelli di espressione.
Comparando un estratto proteico indotto con uno non indotto si riesce facilmente ad evidenziare la presenza della proteina eterologa putativa, di cui conosciamo il peso molecolare.
Come sappiamo, i batteri si sono evoluti per adattarsi rapidamente ad un ambiente altamente variabile, ottimizzando al massimo i consumi energetici. I loro geni, generalmente raggruppati in unità di trascrizione dette operoni, tendono ad esprimersi solo quando serve (come ad esempio i geni per l'utilizzo di zuccheri) o a smettere di esprimersi quando non serve, ad esempio i geni per la sintesi di aminoacidi.

BIOREATTORE

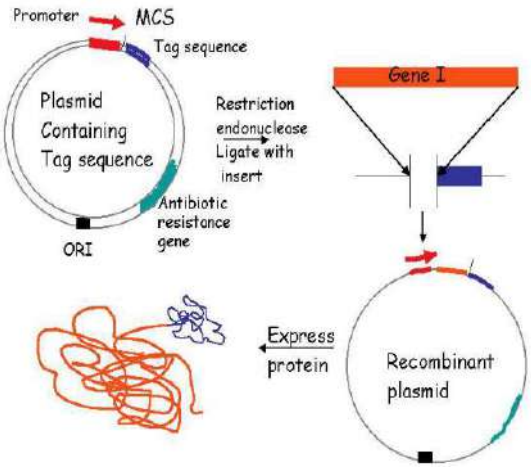
- scelta del sistema cellular;
- scelta del vettore di espressione;
- clonaggio nel sistema cellular;
- ottimizzazione del mezzo di coltura;
- scaling up;
- controllo qualità.

Caratterizzazione della proteina, determinazione dello stato di purezza:
Deve:

- escludere l'ingresso di organismi contaminanti (asettico);
- contenere gli organismi desiderati;
- mantenere il volume della coltura costante;
- mantenere il livello di ossigeno disciolto sopra valori critici di aerazione e agitazione per organismi aerobici;
- controllare parametri come temperatura e pH;
- consentire una buona miscelazione della coltura.



Quando si vogliono isolare proteine ricombinanti può essere utile disporre di qualcosa che può servire per catturare la proteina ricombinante che viene dall'attività di un transgene.
Se una regione del tag si può legare con determinate sostanze, si può isolare la proteina.
Questo transgene si può ingegnerizzare come meglio si credo, si possono mettere delle etichette a queste proteine ricombinanti, dei tah, in genere pochi aa, o piccole proteine che possono essere riconosciute in qualche modo.
Per cui se una regione di questa bandierina si può legare con determinate sostanze in modo da tirarla via, si fanno le cromatografie per affinità.
Serve una matrice, macromolecola di supporto, un ligando che leghi la proteina target in maniera selettiva: c'è questa bandierina che è un pezzo di sequenza target messa insieme al transgene, si esprime la proteina di fusione e quella espressa dal transgene, e passa la colonna che porta attaccato il ligando in grado di legarsi in maniera specifica, si lava via tutto il resto e si fa un'eluizione in modo da recuperare la proteina ricombinate in forma pura.
Se la bandierina dà noia è possibile tagliare la regione con la bandierina senza portarsi dietro il tag, con trattamenti con il bromuro di cianogeno, sito di taglio con endonucleasi.
Le ditte forniscono plasmidi con modifiche tali da ottenere la proteina ricombinate i forma pura, una molta usata è una coda di sei istidine attaccate alla proteina.
Si fa una cromatografia per affinità con la proteina di fusione, che porta legato il nickel che ha affinità selettiva per i residui di istidina, e quindi questa colonna permette di attaccarsi alla proteina ricombinante al supporto, poi viene lavato via ed eluita la proteina ricombinante con il suo tag che può essere staccato, questo sia in condizioni native che denaturanti, e per visualizzarlo si usa la SDS-PAGE.

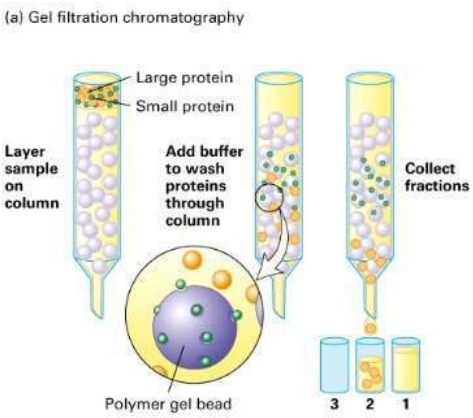


La line 2 è il lisato di E. coli, e prodotta in E.coli prima di essere legata alla resina si vedono le bande che conterranno tutte le proteine di E. coli, non si potrebbe mai distinguere quella buona, ma dopo l'eluizione soltanto quella buona si vede ad una certa altezza, e la GFP attaccata con una coda di sei istidine.
La bandierina, il tag può essere anche una proteina piccola, l'importante è che abbia capacità di legare determinati leganti come la glutatione-S-transferasi che è un enzima batterico che non interferisce con le cellule, e si usa una colonna di affinità con agarosio e granuli di glutatione che legano la glutatione-S-transferasi legandosi in maniera specifica, e la bandierina attaccata alla proteina x per cui si separa questa proteina da tutte le altre fuorché da altre che possono interagire con la proteina verde, per cui non solo si ha l'isolamento della proteina che vogliamo purificare, ma anche l'isolamento di proteine che interagiscono con quella verde, per cui complessi proteici purificati e caratterizzazione in modo da sapere con chi si lega questa proteine verde
Tag di purificazione di affinità possono essere fusi a qualsiasi proteina ricombinante di interesse, consentendo una veloce e facile purificazione, utilizzando le proprietà di affinità del tag.
Alcuni tag vengono utilizzati perché codificano un epitopo che può essere purificato o rilevato da un anticorpo specifico o perché permettono la purificazione semplificata di una proteina desiderata.

Le molecole possono essere separati in base a:

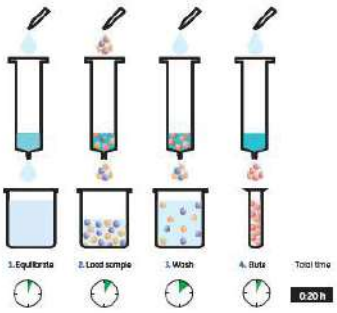
1) filtrazione SIZE-Gel;
2) scambio di carica-Ion;
3) legame specifico-Affinity.

1) Gel filtrazione cromatografia - separazione per dimensione:
le colonne hanno diversi pori di dimensioni, le grandi proteine non passano dai pori, mentre le piccole proteine entrano nei pori e scorrono lentamente.



2) Cromatografia a scambio ionico - la separazione con addebito:
le cariche positive legano gli amminoacidi acidi, mentre quelle negative legano gli amminoacidi basici.
Diverse proteine si legano con diversa affinità, eluite con crescente quantità di sale (NaCl o KCl), differenti proteine eluiscano a diverse concentrazioni saline.

3) Cromatografia di affinità - la separazione da interazioni biologiche vincolanti:
MATRICE + **LIGANDO** = **ML**
Macro molecola di supporto (legato alla matrice) complesso matrice-ligando



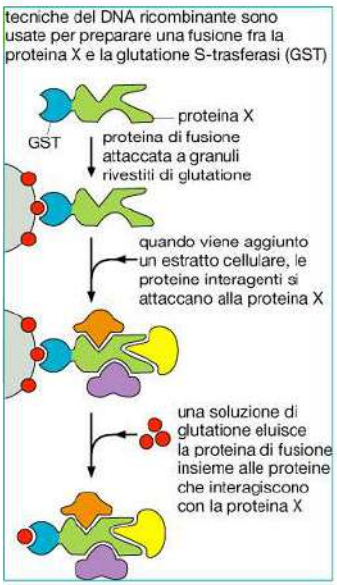
Matrice: dovrebbe essere inerte, idrofilica, resistente alla degradazione chimica e biologica.
es.Cellulosa, Silice, Vari polimeri sintetici organici;

ligando: dovrebbe essere capace di legarsi alla proteina target in modo selettivo e reversibile.

Ml: dovrebbe offrire stabilità e interferenza minima con la reazione di legame.

Si lava via tutto il resto e si fa un'eluizione in modo da recuperare la proteina ricombinante in forma pura.

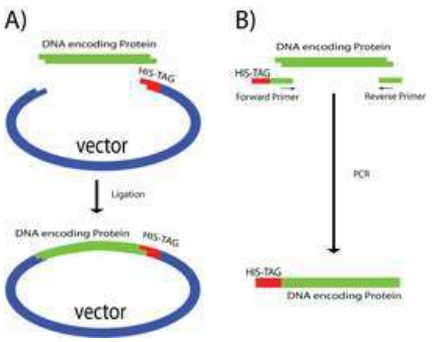
SCELTA DEL TAG



Il tag può essere una piccola proteina, ad esempio il GST-tagged Proteins, glutatione S-transferasi, enzima batterico di 211 amino acidi (26kDa), capace di legarsi con forza al glutatione, un tri-peptide.
La purificazione di complessi proteici che interagiscono con una proteina di fusione-GST può essere fatta in uno stadio mettendo l'estratto cellulare su una matrice di colonna alla quale è immobilizzato glutatione.
La proteina desiderata deve essere l'unica che si può legare, e può essere rimossa di nuovo lavando la colonna con una soluzione di glutatione.

POLYHISTIDINE-TAG: PROTEINA 6HIS-TAG

A) L'HIS-tag è aggiunto inserendo il DNA che codifica una proteina di interesse in un vettore che contiene il tag pronti per fondere al C-terminale;



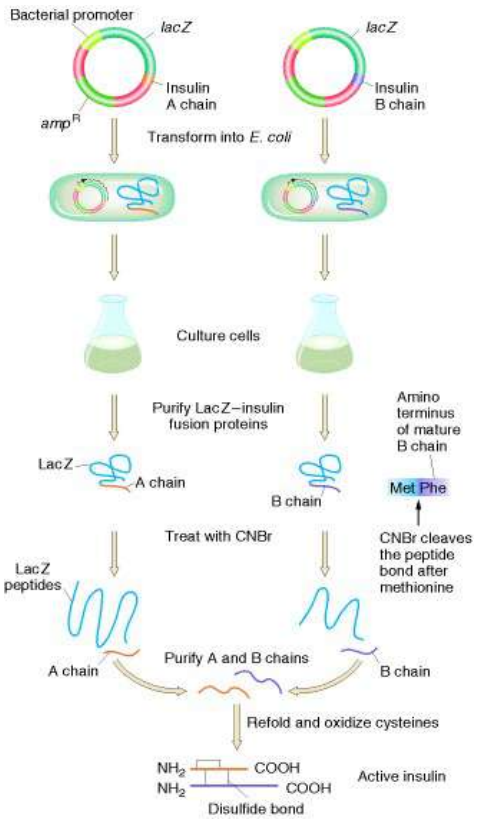
B) L'His-tag viene aggiunto usando primers contenenti il tag, dopo una reazione di PCR l'etichetta viene fuso al N-terminale del gene.

Diciotto basi di codifica, sei istidine, sono inserite subito dopo il codone di inizio o a destra prima del codone di stop.
Almeno 16 basi specifiche per il gene di interesse sono necessari accanto all'His-tag, la proteina avrà l'aggiunta di 1 kDa di peso molecolare.

Il tag più comunemente usato per la purificazione e la rilevazione delle proteine espresse ricombinanti è il tag polyhistidine, e la purificazione di proteine utilizzando questo si basa sull'affinità dei residui di istidina per il metallo immobilizzato come nichel, che permette la purificazione selettiva di proteine.
Il metallo è immobilizzato su un supporto attraverso la formazione del complesso con un chelato che è legato covalentemente al supporto.
Due siti sono disponibili per il legame polyhistidine-tag e sono coordinati con istidina in presenza di un polipeptide polyhistidine-tag.
I tag polyhistidine offrono diversi vantaggi per la purificazione della proteina, le piccole dimensioni del tag polyhistidine rende meno immunizzanti altri tag più grandi, pertanto il tag di solito non ha bisogno di essere rimosso per applicazioni a valle seguenti purificazione.
Il tag polyhistidine può essere posizionato sia sul N- o C-terminale della proteina di interesse, l'interazione del tag polyhistidine non dipende struttura terziaria del tag, rendendo possibile purificare proteine altrimenti insolubili utilizzando condizioni denaturanti.
La proteina può essere eluita specificamente con imidazolo (la stessa sostanza chimica come istidina catena laterale).

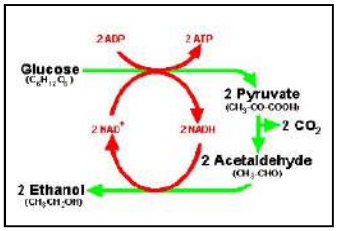
PRODUZIONE DI INSULINA RICOMBINANTE IN BATTERI
(primo farmaco ricombinante in commercio 1982)

L'alternativa sarebbe la purificazione da maiale, e ci vorrebbero 70 maiali per 1 paziente per un anno, quindi alti costi e rischio di trasferimento di virus.



Plasmidi separati codificano per la catena A, 21 aminoacidi, e la catena B, 30 aminoacidi.
Si usa un promotore e alcuni codoni iniziali Lac-Z, proteina di fusione.
Le sequenze di Lac-Z sono eliminate per trattamento con bromuro di cianogeno, che taglia dopo una metionina.
Le catene A e B non contengono metionine interne.
Le catene purificate, mescolate assieme in opportune condizioni si uniscono formando due ponti disolfuro S-S.
L'insulina è un ormone peptidico dalle proprietà anaboliche, prodotto dalle cellule beta delle isole di Langerhans all'interno del pancreas, è formata da due catene unite da due ponti solfuro.
La sintesi di insulina umana sintetica è stata possibile svolgendo un processo simile alla fermentazione usata per fare gli antibiotici e tecniche di DNA ricombinante.
La stragrande maggioranza di insulina attualmente utilizzata nel mondo è ora una biosintesi ricombinante di insulina "umana" o di suoi analoghi.
Anche in campo medico si deve riconoscere l'enorme passo in avanti: uno dei vantaggi di produrre insulina con il metodo del DNA ricombinante è quello di ridurre la dipendenza dalle ghiandole animali e contemporaneamente realizzare un prodotto chimicamente identico all'insulina umana che elimina o comunque riduce notevolmente le reazioni allergiche nei pazienti affetti da diabete.

BIOTECNOLOGIE MICROBICHE TRADIZIONALI IN USO ANCORA OGGI:



Fermentazione dei lieviti come i Saccharomyces:
Questo lievito, in assenza di ossigeno, produce energia tramite la fermentazione degli zuccheri, processo che produce anidride carbonica e etanolo.
Nella fermentazione delle bevande è utile la produzione dell'etanolo, mentre nella lievitazione del pane l'anidride carbonica gonfia la pasta e l'etanolo evapora.

Fermentazione lattica:
Microorganismi, batteri lattici, usati per fermentare i cibi da circa 4000 anni, come produzione di yogurt e formaggi.
Batteri lattici specifici, lattobacilli, producono lattasi, un'idrolasi che nel latte catalizza la reazione:

$$\text{lattosio} + H_2O = \text{galattosio} + \text{glucosio}$$

Una molecola di glucosio è poi trasformata in due molecole di acido piruvico che vengono successivamente ridotte ad acido lattico.
Il parmigiano è facilmente digeribile per la presenza di enzimi, da batteri lattici, che modificano la caseina.
È indicato per le persone intolleranti al lattosio, carenza di lattasi endogena, e alle proteine del latte vaccino.
I microrganismi bioingegnerizzati sono ormai svariati, come ad esempio il caglio, una chimosina, una proteasi un tempo estratta dallo stomaco del vitello, caglio, è ora prodotta come chimosina ricombinante in microorganismi per essere usata per la produzione industriale di formaggio.
Si ha un'elevato grado di purezza rispetto al caglio animale.

La produzione dello yogurt è favorita dall'attività di simbiosi tra le due specie di batteri utilizzati, Streptococcus thermophilus e Lactobacillus bulgaricus, dove ciascuna specie stimola la crescita dell'altra.
Questa interazione riduce il tempo necessario per la fermentazione e consente la formazione di un prodotto con caratteristiche diverse rispetto a quello che si otterrebbe dalla fermentazione con le singole specie microbiche.
I fermenti lattici sono organismi monocellulari e in uno Yogurt devono essere presenti, vivi, in ragione di almeno 2 milioni per grammo al consumo.
La frazione lipidica del prodotto fermentato rimane praticamente identica a quella del latte di origine, mentre le proteine, caseina del latte, vengono parzialmente idrolizzate e rese quindi molto più digeribili.
Rispetto ai formaggi, nello Yogurt, le proteine del siero, lattoalbumina e lattoglobulina, rimangono all'interno del prodotto e la presenza simultanea di lattosio e acido lattico rendono immediatamente e maggiormente disponibili microelementi quali il calcio ed il fosforo, abbondantemente presenti sia nel latte che nello Yogurt.
L'elevata acidità del prodotto fermentato favorisce lo sviluppo di una flora batterica intestinale in grado di contrastare con successo i fenomeni putrefattivi presenti all'interno dell'intestino umano.
Il parmigiano reggiano è ricco di aminoacidi essenziali e facilmente assimilabile, per la presenza di enzimi che modificano la caseina e la rendono altamente digeribile: per questo motivo è indicato anche per le persone intolleranti alle proteine del latte vaccino.
Si caratterizza inoltre come un alimento privo di lattosio.
La chimosina è una proteasi trovata nel caglio, che è prodotto da ruminanti neonati nel rivestimento del quarto stomaco per cagliare il latte che ingeriscono, permettendo una residenza più lungo nelle viscere e migliore assorbimento.
È ampiamente usato nella produzione di formaggio, e la chimosina bovina ricombinante è ora prodotta in Aspergillus niger, un fungo.

PRODURRE PROTEINE RICOMBINANTI

I principali settori di applicazione delle biotecnologie, con risultati diversi per quanto riguarda sia i tempi sia i risvolti economici, sono quello dell'industria chimica e dell'ambiente, il biomedico-sanitario e quello agroalimentare e zootecnico.
Alcuni esempi sono:

- produzione di centinaia di enzimi di restrizione;
- produzione di farmaci di natura proteica;
- produzione di vaccini ricombinanti;

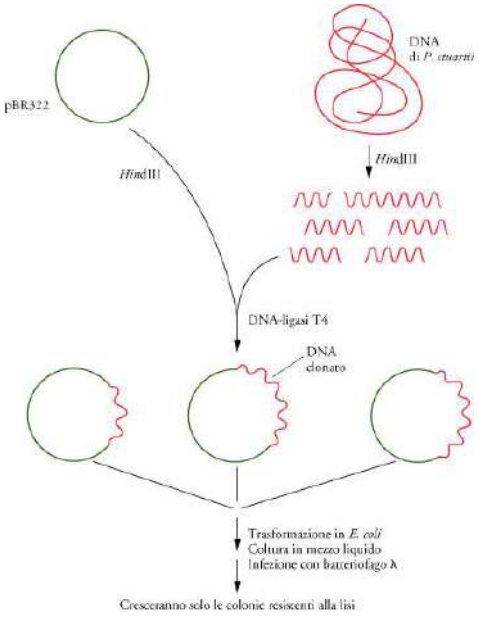
Produrre tanti enzimi diversi richiede crescite di numerosi microrganismi, ciascuno con condizioni particolari oppure utilizzare solo Escherichia coli ricombinante.
Per la produzione di endonucleasi di restrizione in E. coli, si deve evitare la digestione del DNA di questo da parte di un enzima di restrizione estraneo.
Si deve clonare ed esprimere il gene della endonucleasi di restrizione più il gene dell'enzima di modificazione, metilazione.
Per la protezione contro la self digestion la metilasi specifica si deve esprimere nell'ordine temporale corretto, cioè prima dell'endonucleasi.

Questo è conveniente solo se i geni dell'endonucleasi di restrizione e dell'enzima di modificazione sono vicini nel cromosoma.

Clonazione ed espressione del Pst I, sistema di restrizione-modificazione in Escherichia coli:

1) Genoteca di Providencia stuartii in E. coli;
2) Infezione con fago l.

Il DNA fagico può passare da un batterio all'altro dello stesso ceppo perché ha lo stesso pattern di metilazione dell'ospite e non viene quindi riconosciuto.
Il pattern di metilazione viene acquisito durante un'infezione da un piccolo gruppo di fagi che sfuggono all'attacco e si replicano in presenza della metilasi dell'ospite.

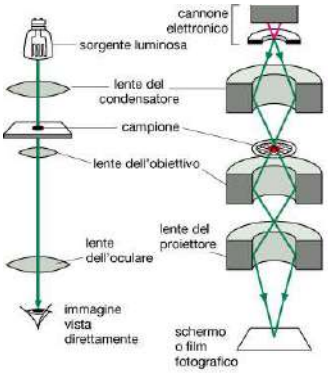


Questi fagi saranno d'ora in poi capaci di replicarsi nel nuovo ospite
PstI è prodotto da Providencia stuartii.
Il DNA cromosomale di P. stuartii viene digerito con HindIII e ligato nel sito HindIII di pBR322.
La banca di cloni è trasformata in E. coli.
Le cellule di E. coli trasformate sono infettate con fago lambda.
Se la RE è espressa in E. coli allora le cellule saranno resistenti all'azione litica di lambda perché la RE degrada il DNA del fago infettante.

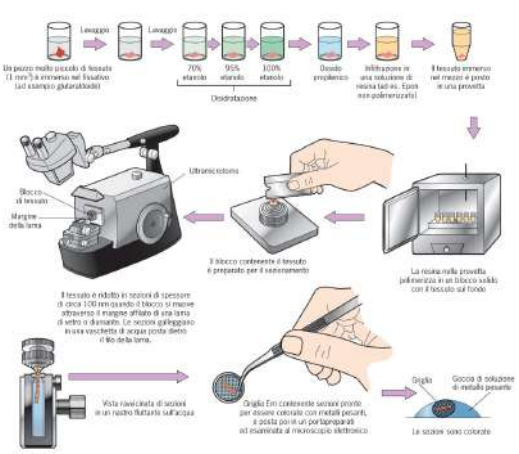
I trasformanti di Escherichia coli che trasportano il gene Pst I inserito nel vettore pBR322 di clonaggio sono stati selezionati sulla base della resistenza acquisita alle infezioni batteriofago lambda.
Pst I endonucleasi è stata rilevata nel liquido di shock osmotico di ciascuno dei cloni resistenti.
Plasmidi e DNA cromosomale di questi cloni non possono essere digerite dal Pst I, indicando che il gene per l'enzima corrispondente modificato era stato clonato e veniva espresso.

Il più piccolo plasmide ricombinante che codifica per entrambe le attività, pPst201, contiene un inserto di circa 4000 paia di basi.
Studi in vitro di trascrizione indicano che questo frammento di DNA contiene anche il promotore endogeno del sistema, quando pPst201 è stato introdotto in un ceppo mini cellule produttrici di E. coli, due nuove proteine sono state sintetizzate, Pst I (metilasi) e enzima di restrizione.
La forma attiva dell'enzima di restrizione è un dimero.
Trasformanti costruiti con P. stuartii 164 che portano il sistema Pst I inserita in pBR322 producono circa 10 volte più Pst I attività endonucleasi di quanto non faccia il ceppo nativo.

IL MICROSCOPIO ELETTRONICO

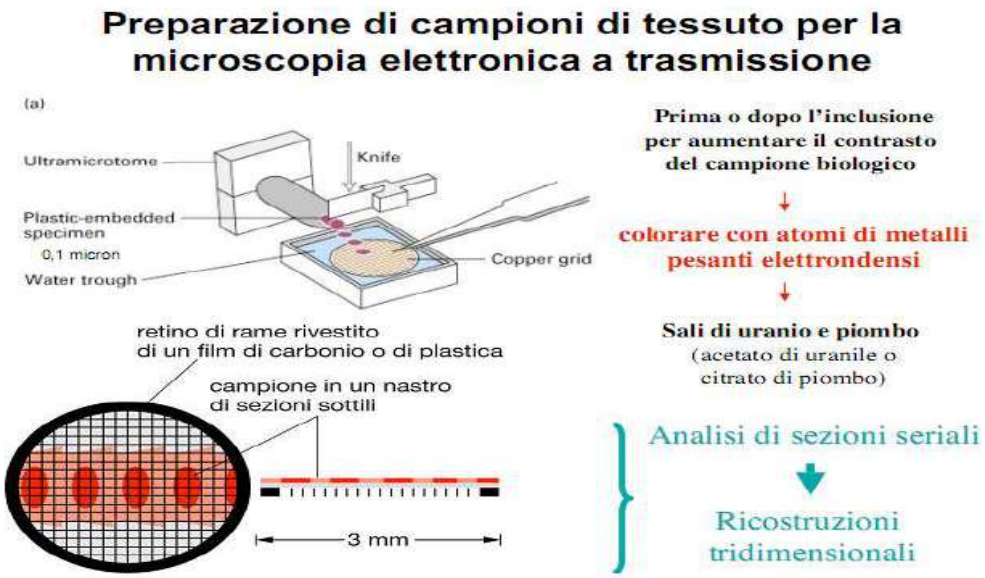


Il limite di risoluzione del ME è di 100 volte il MO, la risoluzione effettiva nei preparati biologici è di 20 A° = 2nm.



La glutaraldeide è un fissativo non coagulante, penetra rapidamente nei tessuti.
Il tetrossido di osmio funziona come un fissativo secondario reagendo con i lipidi.
I legami insaturi degli acidi grassi sono ossidati, ed il tetrossido di osmio si riduce a osmio metallico (nero), che è elettrondenso e aggiunge contrasto ai tessuti biologici.

Resine epossidiche = miscele di aldeidi, che polimerizzano a 60°C



PARTICOLARI TECNICHE IN USO IN MICROSCOPIA ELETTRONICA

Colorazione negativa:
Viene applicata soprattutto allo studio dei virus e delle macromolecole
Il campione, sospeso in un colorante elettrondenso, è applicato su un retino ricoperto di un sottile film di plastica, il quale si asciuga all'aria e si osserva al TEM.
Il colorante riempie gli spazi vuoti che appariranno scuri, mentre i virus o le macromolecole appariranno chiare.
I metalli pesanti depositati su una griglia porta-campione si trovano dovunque tranne dove è presente il campione.

Ombreggiatura al platino – è usato per lo studio delle macromolecole:

1) Il campione è adsorbito su un supporto liscio (lastra di mica);
2) Sotto vuoto spinto e sotto rotazione, sul campione viene proiettato, sotto un angolo di 5°-15°, un sottile strato di platino (elettron-denso) che evapora da un elettrodo al Platino reso incandescente;
3) Lo strato di platino, che rappresenta la replica della superficie del campione, è stabilizzato da uno strato di carbone fatto cadere dall'alto da un elettrodo di carbone (elettron-chiaro);
4) La replica di platino è prima trasferita in un bagno alcalino che degrada il campione;
5) Dopo lavaggio è trasferita su un retino per l'osservazione al TEM.

Freeze fracture o freeze etching:
Consiste nel congelare rapidamente il materiale fresco, fratturarlo con una lama fredda e quindi vaporizzarlo con uno strato di carbone e platino per ottenere uno stampo della superficie di frattura

1) Il campione è criofissato in azoto liquido, l'acqua è vetrifica;
2) Il campione viene posto sotto vuoto e inciso da una lama fredda, il piano di frattura preferenzialmente avviene lungo il doppio strato delle membrane biologiche, e si hanno deviazioni del piano di frattura prodotte dalle varie strutture subcellulari, si formano quindi depressioni, creste, innalzamenti che sono visualizzati con una replica delle due superfici, ombreggiate con un metallo;
3) Dopo la rimozione della parte organica si ha l'osservazione al tem.

Immunogold:
Immuno-localizzazione di macromolecole specifiche, non si ha penetrazione all'interno della resina.

Autoradiografia:
Se una struttura contiene isotopi radioattivi, vengono sfruttate le radiazioni da loro emesse per ridurre in argento metallico il bromuro d'argento dell'emulsione fotografica ottenendone l'impressione.

Tale isotopi (in genere in citologia si usa ^{3}H o ^{35}S) emettono radiazioni β a bassa energia, che hanno una scarsa penetrazione e, in genere, sono schermate dopo aver percorso pochi micron.
I raggi emessi impressionano i sali di argento (AgBr) di un'emulsione fotografica, in precedenza distesa sulla sezione istologica.
Il vetrino è tenuta al buio e dopo alcuni giorni, si procede allo sviluppo e al fissaggio.
Al microscopio ottico o elettronico si osservano i compartimenti cellulari positivi per grani di Ag impressionati dai raggi β.

COLTURE MICROBICHE

Escherichia coli:
Agar + ampicillina + X-Gal + IPTG Limiti della selezione per α-complementazione.

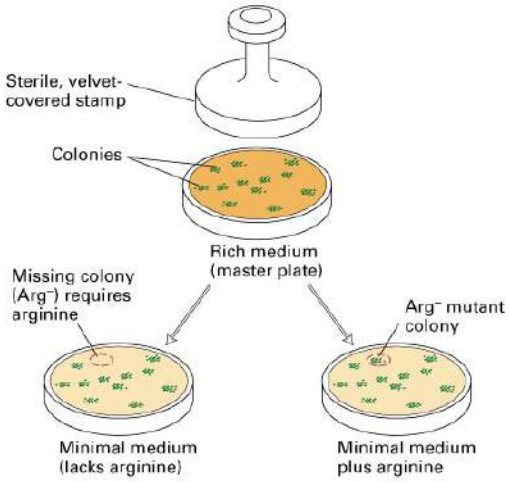
Bisogna considerare che la selezione bianco-blu può talvolta essere ingannevole, qualche volta cloni bianchi risultano essere negativi, e qualche volta i cloni blu possono essere positivi.
Se l'inserto è relativamente piccolo, infatti, e risulta inserito in registro con lo schema di lettura della ß-galattosidasi o dell'α-peptide, si può formare una proteina di fusione parzialmente o totalmente attiva, in questo caso, dunque, un clone ricombinante con un inserto correttamente inserito, manterrà comunque attività ß-galattosidasica e produrrà colonie blu.
D'altro canto può accadere che colonie bianche risultino in realtà contenere solo vettori vuoti, è sufficiente, infatti, la delezione di anche una sola base per modificare lo schema di lettura della proteina, facendo perdere completamente l'attività enzimatica.
È sempre opportuno, quindi, selezionare un piccolo numero di colonie bianche, putativamente positive, e sottoporle ad ulteriore analisi con altri metodi, per esempio con enzimi di restrizione e successiva analisi su gel.

Lieviti:
I lieviti sono organismi unicellulari appartenenti al regno dei funghi, sono state catalogate più di mille specie di lieviti, alcune sono comunemente usate nella produzione degli alimenti, per lievitare il pane e far fermentare le bevande alcoliche.
Il lievito più comunemente usato è Saccharomyces cerevisiae, sfruttato da migliaia di anni per la produzione di vino, pane e birra.
Questo lievito, in assenza di ossigeno, produce energia tramite la fermentazione degli zuccheri, processo che produce anidride carbonica e etanolo.

Terreni di coltura = si cerca di riprodurre artificialmente un ambiente in grado di soddisfare le esigenze metaboliche del microorganismo da coltivare.

Anche se le colonie sono formate da microrganismi geneticamente identici, casualmente si possono verificare mutazioni spontanee, ad esempio mutazioni a carico della via biosintetica dell'adenina in cellule di lievito.
Le cellule mutate possono quindi essere separate anche in base alla loro capacità di sopravvivere in condizioni ambientali avverse.

Esempio: isolamento di ceppi mutanti auxotrofi nutrizionali = incapaci di crescere in mancanza di uno specifico nutriente



L'AUTOCLAVE: pressione di 1 atm = 121°C e tempo di 15 minuti.
Il vapore deve poter entrare in contatto con le soluzioni, quindi bottiglie aperte.
P/T minori e tempi maggiori per limitare il danno ai composti organici (imbrunimento, caramellizzazione).

N.B.: Molti zuccheri e gli antibiotici devono essere sterilizzati per filtrazione.

Zika:
È un virus che è in grado di infettare solo il 10% dei tipi di tessuto tra cui le cellule più avanzate del cervello, le cellule renali e cellule staminali embrionali.
Prof Guo-Li Ming, uno dei ricercatori, ha detto che i risultati sono stati significativi e ha rappresentato un primo passo per comprendere il legame tra la microcefalia e Zika.
Le cellule progenitrici neurali sono particolarmente vulnerabili al virus Zika, non è chiaro il motivo per cui lo siano, ma sembra che non diano una risposta immunitaria alle infezioni Zika.
Anche se non definitiva, lo studio si aggiunge alla crescente evidenza tra cui Zika è stato trovato nel cervello dei bambini morti, così come nel liquido amniotico.

COLTURE CELLULARI

Sono cellule isolate dal loro ambiente e messe in condizioni di vivere all'interno di un sistema definito.
Le tecniche di base per coltivare e manipolare cellule sono la crescita di microorganismi in coltura e la crescita di cellule animali in coltura.
Queste interessano campi di ricerca differenti come la biologia cellulare e molecolare, la virologia, o l'immunologia.
Le colture cellulari possono essere utilizzate per diversi scopi:

- le cellule coltivate in vitro possono fungere da materiale di partenza per l'estrazione di acidi nucleici o proteine;
- le cellule possono essere utilizzate per studi funzionali o di regolazione;
- per rigenerare in vitro tessuti o organi.

I vantaggi di una coltura cellulare sono che si può avere un controllo rigoroso dell'ambiente in cui la cellula vive, come pH, temperatura, gas, e quindi si ha una risposta più omogenea rispetto a quella che si avrebbe nei tessuti, poiché in questi ci sono altere interferenze.
In queste colture è possibile far cresce dei cloni, e in tal modo se ci sono dei mutanti si possono isolare.
Tutto questo ha lo scopo di ridurre la sperimentazione animale, ma dopo aver fatto tali studi bisogna comunque fare delle prove in vivo.
Ci però anche degli svantaggi, come ad esempio il fatto che coltivare le cellule di mammifero non è come coltivare batteri o lieviti, poiché sono molto più delicate questo tipo di cellule e si inquinano facilmente, quindi ci vogliono degli ambiente appositi specializzati e sterili, ed inoltre si ha un costo elevato dei terreni e di tali strumenti.
Queste cellule hanno inoltre problemi di differenziamento, e sono sistemi molto semplificati rispetto ad un organismo, quindi ci sono delle difficolta a correla ad esempio le concentrazioni di eventuali farmaci.

La falloidina è una micotossina presente in alcune specie di funghi velenosi, a livello del citoscheletro questa si lega a filamenti di actina molto più strettamente che ai monomeri, stabilizzandoli, e prevenendone la depolimerizzazione, impedendo in questo modo i movimenti citoplasmatici.
Serve un microscopio ottico fluorescente ad UV per poterla osservare, e assume una colorazione rossa.
Questo è un esempio di come le cellule in coltura si presentino in vari modi in base agli strumenti utilizzati.

Per poter fare queste colture cellulari si deve fare una distinzione tra:

- colture a breve termine,si ottengono da linfociti del sangue circolante o analisi prenatale dei cromosomi, durano circa 72-96 ore;
- colture a lungo termine o clonali, si ottengono isolando singole cellule e facendole espandere in una coltura.

Per farle si parte dai tessuti, i quali devono essere prelevati, si possono usare sia tessuti di origine embrionale, che tessuti di origine adulti o tumorali.
La prima cosa da fare dopo la prelevazione è la dissociazione, ovvero staccare le cellule le une dalle altre e dalla matrice cellulare.

Tessuti embrionali:
Per colture derivanti da cellule embrionali, si può usa il liquido amniotico.
Queste colture possono essere usate per avere analisi biochimiche o analisi del cariotipo ad esmpio.

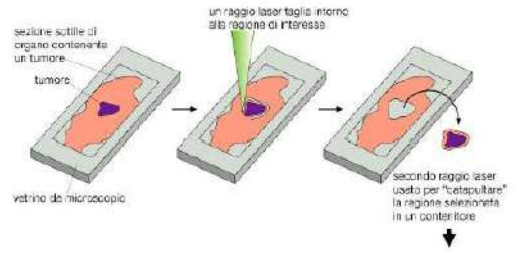
Le cellule che si hanno da questo tipo di tessuto, oltre che dal liquido amniotico, possono essere prese dalla blastocisti, l'ammasso di cellule da cui poi di origina l'embrione, e le quali sono molto importanti perché sono l'origine delle cellule stamina embrionali.

Tessuti adulti o tumorali:
I tessuti adulti sono tessuti soggetti all'omeostasi, al rinnovo, dovuto a cellule staminali.
Queste cellule staminali non sono però come quelle embrionali, sono cellule staminali somatiche, o adulte, e sono presenti in tutti i tipi di tessuti.
Il loro scopo è diverso, le cellule embrionali hanno la funzione di formare un embrione, queste invece hanno la funzione di presiedere il rinnovamento tissutale, particolarmente importante in tessuti che si rinnovano spesso, come i villi dell'intestino, ma sono importanti anche in tessuti perenni che non si rinnovano mai, come sistema nervoso.

In coltura è possibile mettere anche fibroblasti o cellule nervose, oltre che le staminali, oppure le cellule tumorali, quest'ultime sono importanti per poter studiare le caratteristiche di un tumore senza l'influenza delle cellule sane circostanti.

MICRODISSEZIONE DEI TESSUTI TRAMITE LASER

La microdissezione laser, sotto visualizzazione microscopica diretta, permette una rapida acquisizione di popolazioni cellulari umane selezionate da una sezione di tessuto complesso, eterogeneo.



Il campione selezionato viene rimosso attraverso il laser ad infrarosso controllato da software e catapultato verso un collettore.
Questo tipo di procedura assicura la totale assenza di contaminazione, oltre a garantire la conservazione del materiale da analizzare, poiché il laser, che ha range d'emissione compreso tra 600 nm e 1200 nm, diretto sul campione per circa 1 nanosecondo, non trasferisce alcun calore
Si prevengono così anche danni ai sistemi di cellule in vivo.
È un metodo estremamente efficace e non invasivo per la manipolazione di cellule utilizzando il campo di forza generato da un raggio laser a fuoco, trappola ottica, e la manipolazione viene eseguita senza contatto meccanico.

Terapia mirata:
La moderna ricerca sui tumori lavora in modo preciso in circa un terzo dei pazienti che hanno metastasi da tumore al seno, la proteina Her2/neu è sovraespressa nel tessuto mammario.
La stima del rapporto di questa sovraespressione varia in base al grado e al tipo di tumore, la chemioterapia e la terapia con ormoni convenzionali hanno sicuramente meno effetto in questi pazienti, tuttavia, in pieno contrasto al passato, i pazienti positivi all'Her2 (grado 3+) possono contare oggi su di una buona prognosi se trattati con anticorpi monoclonali che bloccano il recettore Her2 sulla superficie della cellula tumorale.
Requisito essenziale per il trattamento con questi anticorpi è la diagnosi che confermi la presenza dll'Her2 nel tumore, durante le biopsie le cellule tumorali con DNA Her2 amplificato vengono disperse in un sottofondo di cellule con DNA non amplificato, conducendo così ad una diagnosi impropria.
Tutto ciò può essere evitato grazie alla microdissezione laser e all'indagine molecolare di cellule tumorali selezionate. In questo modo, è possibile effettuare una diagnosi affidabile.

Analisi cellulare singola a piccoli gruppi con Microarrays:
Si ha lo sviluppo di marker molecolari per una ricerca personalizzata di cellule maligne o di altri tipi di cellule sospette che possono essere una minoranza sul preparato, tanto che la loro espressione genomica potrebbe non essere evidenziata durante l'indagine su questo tipo di materiale.
L'isolamento di una determinata cellula singola, o di una popolazione di cellule, il più delle volte è un requisito fondamentale per ottenere la descrizione del tipo di cellula e della sua espressione.
Grazie all'analisi dell'espressone genomica di un ridotto numero di cellule, basata sulla tecnica Microarray, addirittura partendo anche da una sola cellula, è possibile gettare le basi per sviluppare marker molecolari affidabili, lo scopo finale è la gestione clinica personalizzata di pazienti singoli o gruppi di pazienti.

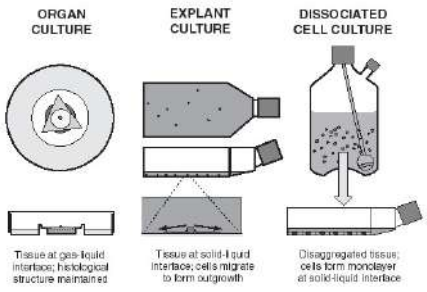
Analisi proteomica:
L'analisi del proteoma è una delle sfide più entusiasmanti dei prossimi 20 anni, la complessità del proteoma è estremamente elevata, poiché ogni organismo, o parte di esso, può differenziarsi considerevolmente nella sua composizione proteica.
Per effettuare studi di proteomica ad alto livello è necessario separare le differenti aree funzionali di tessuto prima di eseguire l'analisi, questa separazione può essere eseguita con la microdissezione laser, le cui sezioni appartenenti a differenti tipi di tumore vengono analizzate su ProteinChip arrays, ed i risultati vengono comparati con i campioni adiacenti "non tumorali".
Due proteine differenzialmente espresse vengono isolate.
Questo tipo di approccio apre nuove possibilità per indagare, identificare e caratterizzare biomarker tumorali rilevanti, in questo modo è possibile identificare le proteine invasive e responsabili di metastasi.

Applicazioni su cellule staminali:
Le cellule staminali esprimono una varietà di marker specifici pluripotenziali, i cui livelli d'espressione sono significativi di uno stato indifferenziato.
La manipolazione di cellule staminali embrionali, o adulte, può scatenare una differenziazione accompagnata da modificazioni morfologiche e di pluripotenza dell'espressione dei marker.
Grazie alla tecnica a microdissezione laser, le cellule staminali possono essere isolate e propagate senza modificare l'espressione dei rispettivi marker, inoltre, è possibile separare le colture di cellule staminali con cellule differenziate in sub-popolazioni omogenee.

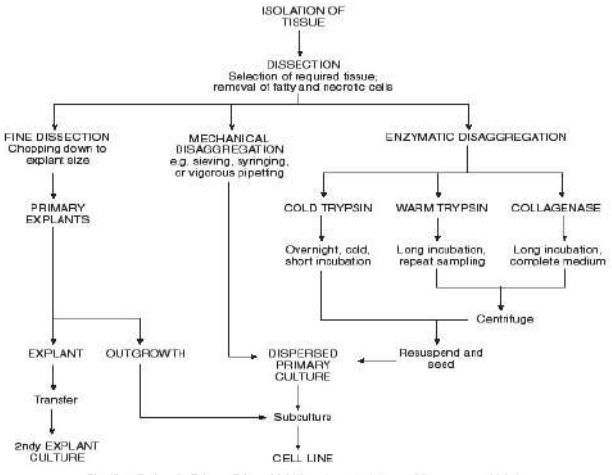
Analisi cellulare individuale:
Le caratteristiche strutturali e funzionali delle cellule sono correlato al loro specifico profilo d'espressione genomica, l'abilità di studiare e comparare questa espressione in ambito cellulare potrà dare luogo a numerose intuizioni sulla fisiologia della cellula che saranno utili a vari settori della ricerca e delle applicazioni cliniche.

ALTRI METODI PER INIZIARE UNA COLTURA

Normalmente una coltura cellulare non si prepara a partire da strumenti così sofisticati.
In generale si parte dal tipo di coltura cellulare che si vuole fare e si ha:



- La coltura di organo: si deve mette in soluzione che mantiene le funzioni fisiologiche di quel tessuto, le cellule rimangono completamente differenziate, e la crescita è lenta.
  Un espianto fresco è richiesto per ogni esperimento.
- La coltura di espianti: il frammento di tessuto si mette in soluzione fisiologica, dove le cellule capaci di movimento ameboide sono libere di muoversi.
  Dopo un paio di giorni si vedono delle cellule che migrano fuori dal tessuto, questo dipende sempre da quale tessuto è stato utilizzato, poiché non tutte le cellule sono in grado di farlo;
- La coltura dissociata: è una dissociazione forzata, si può avere sia meccanicamente, agitando il frammento in modo che le cellule si stacchino, sia enzimaticamente.
  Il modo meccanico è meno preferito a quello enzimatico, poiché pur essendo più semplice può comunque danneggiare le cellule più facilmente, ma in entrambi i casi ci si deve aspettare che una buona parte delle cellule muoiano durante tale processo.



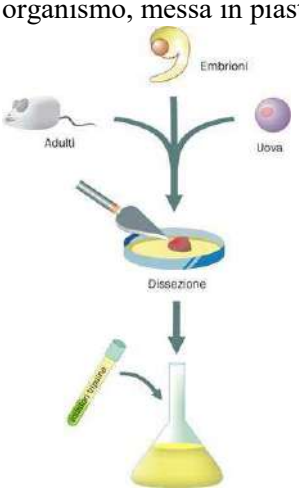
Quando si fa una coltura primaria bisogna sapere tutte le varie caratteristiche.
Ci sono delle tabelle che devono essere riempite dove vengono specificate cose come: la specie, il tessuto originario, la razza, l'età, il sesso, se l'individuo ha avuto malattia, se ha delle patologie, l'agente disaggregante, come è stata eseguita la semina, la conta delle cellule vive, il tipo di terreno di coltura, etc.

Bisogna praticamente elencare ogni singolo passaggio nel dettaglio ed ogni cosa che si utilizza.

Conta delle cellule con la camera di Burker:
La camera di Burker è costituita da un vetro spesso, in cui è ricavata una camera capillare, e la parete superiore della camera è costituita da un vetrino.
Al microscopio si vede una serie di linee ortogonali tra loro, che definiscono una serie di aree e quindi di volumi.
Quando questa si osserva al microscopio, si vanno a contare le cellule presenti nei quadrati delimitati da una doppia barra, e non si contano quelle fuori o che le toccano.
Questa conta si ripete per almeno tre quadrati, e poi si fa una media del numero di cellule contate e si ricava così il numero totale di cellule moltiplicando il numero ottenuto per $25x10^4$.
Si corregge poi per il volume totale della sospensione, il numero che si ottiene è riferito, altrimenti, ad 1ml.

COLTURE PRIMARIE

Le colture preparate direttamente da un tessuto si dicono colture primarie.
Le tappe principali per ottenere una coltura primaria, ovvero una coltura di cellule direttamente da un organismo, messa in piastra, sono:



1) Prelievo delle cellule da un campione, quale organo di un adulto, embrioni o uova;
2) Dalla biopsia si esegue una dissezione meccanica;
3) Si esegue un trattamento con tripsina, per l'eliminazione dei contatti proteici delle cellule con la matrice, e con EDTA, un chelante del calcio, richiesto dall'integrina per ancorarsi alla fibronectina.
   Questo trattamento serve a disgregare i contatti fra cellule;
4) Si blocca la digestione enzimatica con un inibitore, lo stesso siero animale addizionato al terreno di coltura contiene alcuni inibitori;
5) Si centrifuga la sospensione cellulare, e le cellule vengono risospese.

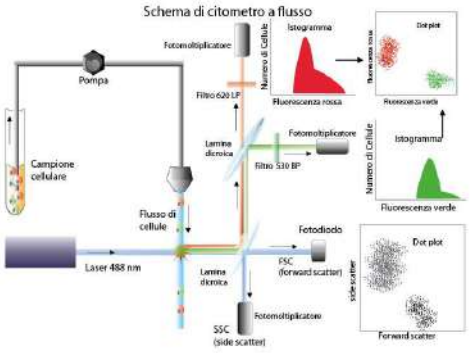
A questo punto si effettua un controllo della vitalità cellulare, ad esempio con colorazione trypan blue, che penetra solo nelle cellule morte, con danni alle membrane, e per cui le cellule integre risultano incolori.
Le colture cellulari possono crescere in monostrato, seminate su terreno solido in piastra Petri, oppure in sospensione, quando possono moltiplicarsi anche senza aderire ad un substrato o non presentano alcuna forma di adesione.
In alcuni casi non è necessario l'uso di un agitatore per ottenere colture in sospensione, che sono senz'altro indicate quando servano grandi quantità di cellule.

I diversi tipi cellulari possono essere separati o utilizzando differenze fisiche fra le cellule, ad esempio si può usare una centrifugazione blanda per separare cellule di dimensioni diverse, oppure sfruttando le diverse capacità di adesione al substrato, ad esempio substrati contenenti anticorpi possono essere riconosciuti da specifiche proteine di membrana e possono favorire l'adesione di tipi cellulari specifici, oppure cellule tumorali possono presentare diversa capacità di adesione al substrato.
Il problema è che si devono separare i vari tipi di cellule, ma anche le cellule morte dalle vive.

CITOFLUORIMETRO A FLUSSO

È uno strumento che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido.
Se dotato di un sistema di separazione delle cellule identificate è chiamato Flow-Activated Cell Sorting o FACS.
Questo controlla il flusso cellulare, le cellule in sospensione vengono iniettate in una singola fila nella camera di flusso, ed il sistema ottico interroga le cellule mentre attraversano un raggio laser, ogni singola cellula genera così dei segnali, che vengono raccolti, filtrati e amplificati.
Il sistema elettronico che raccoglie, raffigura ed analizza i dati, converte i segnali in valori digitali e li invia al computer, quindi si ha una rappresentazione grafica e statistica.
Si può quindi dire che il citoflorimetro è fatto da 3 sistemi: fluido, ottico, elettronico.

Il citometro a flusso ha attualmente l'uso più diffuso nella rapida individuazione della presenza di determinanti antigenici, di membrana o citoplasmatici, effettuata con metodi di immunofluorescenza, ma viene anche impiegato per misurare, a livello di singole cellule, una serie di parametri che vanno dal volume alla "granulosità" cellulare, dal contenuto di DNA, RNA, proteine, all'up-take di farmaci, dal calcio alla permeabilità di membrana, dalle attività enzimatiche al pH intracellulare.
I citofluorimetri rendono quindi possibile la misurazione di proprietà multiple di singole cellule.
Le diverse cellule di una popolazione sono etichettate dal trattamento con anticorpi specifici legati a sostanze fluorescenti o con fluorocromi che si legano in maniera stechiometrica a determinate sostanze come il DNA e l'RNA.
Questi strumenti sono utilizzati per studiare le proprietà dei sottoinsiemi delle cellule identificati usando le proteine monoclonali della cellula-superficie degli anticorpi.
La miscela delle cellule identificate allora è forzata con un molto volume dell'arger di salino attraverso un ugello, creante un flusso fine di liquido che contiene le cellule spaziate separatamente a intervalli.
Poiché ogni cellula l'attraversa un fascio laser, spargono la luce del laser e tutte le molecole della tintura limitate alla cellula saranno eccitate e saranno fluorescenti.

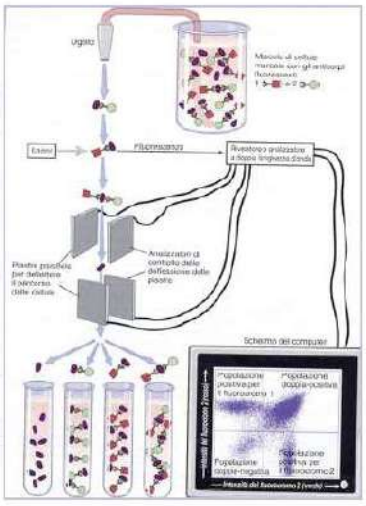


Si va a misurare la rifrazione frontale e laterale emessa da ogni singola cellula.
La rifrazione frontale è misurata da un fotodiodo posto frontalmente al percorso ottico della luce laser, quando il raggio luminoso monocromatico colpisce le cellule, una parte dei suoi raggi viene deviata in diverse direzioni e angolazioni.
La rifrazione laterale è rilevata da un tubo fotomoltiplicatore posto in posizione ortogonale alla sorgente luminosa, esso quindi raccoglie in modo selettivo, per mezzo di uno specchio dicroico, la luce diffratta da ciascuna cellula ad un angolo di 90° rispetto alla luce incidente.
L'incontro tra il raggio di luce e ogni singola cellula presente nel flusso cellulare genera dei segnali fluorescenti, i quali, passando attraverso un sistema di filtri e specchi, raggiungono il rivelatore.
Questi segnali sono legati alle caratteristiche sia fisiche della cellula che alla presenza di molecole fluorescenti.

Fluorescence-activated cell sorter (FACS):
Il sorting consente di raccogliere fisicamente le popolazioni che sono state separate dal resto della miscela.
Si stabiliscono delle finestre di selezione per identificare le popolazioni di interesse che verranno separate e raccolte in provette distinte.
Nel sorter i segnali sono usati per generare una carica elettrica, le cellule cariche possono allora essere deviate dal flusso principale mentre passano fra le piastre di un campo elettrico di modo che le goccioline caricate positivamente sono attratte ad una piastra caricata negativamente e viceversa.
In questo modo specifiche sottopopolazioni di cellule possono essere purificate da una popolazione mista.

Principio di funzionamento della citometria a flusso

1) Le cellule di una popolazione eterogenea vengono aspirate dalla provetta e immesse in una camera di flusso dove vengono separate le une dalla altre.
2) Ogni singola cellula viene poi attraversata da un fascio di luce che eccita i fluorocromi e determina l'emissione di un segnale fluorescente
3) Il segnale passando attraverso un sistema di filtri e specchi raggiunge un rivelatore.
4) Viene quindi processato elettronicamente, trasformato da analogico a digitale e inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico.
5) Attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito "sorting".

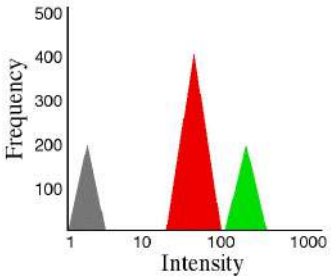


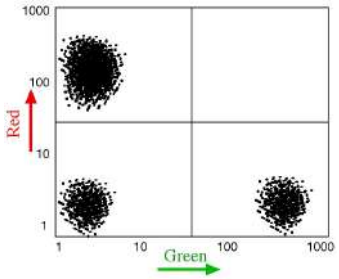
Possono così essere analizzate migliaia di cellule al secondo per:

- determinare il contenuto di DNA e di RNA;
- analisi del ciclo cellulare;
- livelli di apoptosi in patologie.

Elaborazione e rappresentazione dei dati:
L'elaborazione dei dati è eseguita grazie al computer collegato allo strumento, che tramite specifici software provvede a tradurre i segnali in grafici e alla loro rappresentazione su display video in tempo reale.
La rappresentazione più semplice è costituita dall'istogramma dove l'ascissa riporta l'intensità di fluorescenza e l'ordinata il numero di cellule positive, diagramma di distribuzione.

Quantificare i dati ottenuti con il FACS:
Istogramma = in questo esempio ci sono circa il doppio di cellule red rispetto alle green e alle "non marcate", ed il livello di intensità di luce è maggiore per le green.
L'intensità della fluorescenza verde o rossa è tracciata sulla asse X e il numero di cellule con ciascun livello di fluorescenza è tracciata sulla Y.





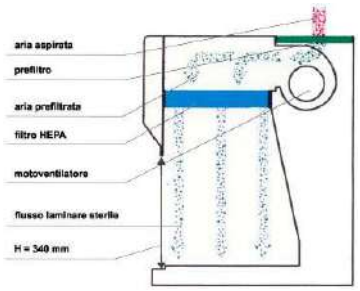
Dot-plot = ogni singolo punto rappresenta un evento, cellule individuali.
Il numero di cellule verdi marcato è circa uguale al numero di cellule non marcate, ma il numero di globuli rossi marcato è circa due volte quella delle altre due categorie di cellule.
Anche in questo caso, possiamo vedere che il livello della fluorescenza è stata maggiore nelle cellule verdi rispetto a quelle rosse.
Questo tipo di grafico non dà il numero delle cellule, ma le dimensioni della nuvola che si crea, si sfrutta quindi soltanto l'intensità di fluorescenza.
In questo esempio si ha l'intensità della fluorescenza rossa sulle Y e l'intensità della fluorescenza verde sulle X.
Questo tipo di grafico è particolarmente utile se sono presenti cellule che sono state etichettate sia rosso e verde.

IN LABORATORIO

Sterilità:
Al fine di mantenere la sterilità per la coltura cellulare, il laboratorio deve essere esclusivo, occorre lavorare sotto cappe a flusso laminare, alle quali vanno sostituiti periodicamente i filtri.
Per la sterilizzazione dei materiali, invece, occorrono strumenti come:

- Stufa a secco, 150°C per 3 ore → per la vetreria;
- Autoclave (calore umido), 1 atm, 121°C → per filtri, soluzioni saline, etc.;
- Filtrazione con filtri da 0.22 μm → terreni di coltura, soluzioni organiche, etc.;
- Raggi γ → materiali di plastica.

La cappa a flusso laminare:
La cappa a flusso laminare verticale è stata studiata e realizzata per consentire manipolazioni in ambiente sterile di materiali vari.
La protezione totale da germi e pulviscolo estende l'utilizzo di questa cabina ai più svariati settori: microbiologico, farmaceutico, elettronico, ottico.
La cabina non è idonea per la manipolazione di micro-organismi o particelle che costituiscono un rischio per l'operatore e l'ambiente.
Pur operando in condizioni di sterilità, lavorando con le colture cellulari c'è sempre rischio di contaminazione da parte di batteri, funghi, micoplasmi e virus.



Mentre la contaminazione da batteri e miceti è facilmente identificabile, poiché provoca un intorbidimento del terreno, quella da virus e da micoplasmi è più difficile da identificare, tranne che si riscontri un effetto citopatico.
Per ridurre il rischi di contaminazioni, perciò, vengono aggiunti ai terreni da coltura degli agenti antibiotici, come penicillina o streptomicina, e antimicotici.
La contaminazione da Micoplasmi viene rilevata tramite rilevazione di adenosina fosforilasi, con colorazione con fluorocromi del DNA, e l'eliminazione del micoplasma si ottiene di solito tramite trattamento con l'antibiotico BM-ciclina.
Per prevenire le contaminazioni occorre seguire alcune regole:

1) i terreni e le soluzioni che si usano devono essere tutti sterili;
2) aggiungere penicillina-streptomicina per scongiurare il pericolo di contaminazioni da batteri, e anfotericina B, se non tossica per le cellule, contro i miceti;
3) destinare il laboratorio solo alle colture cellulari;
4) operare sempre sotto cappa a flusso laminare;

5) utilizzare solo materiale sterile, di vetro o di plastica;
6) utilizzare sempre pipettatori elettrici;
7) pulire bene la cappa a inizio e fine lavoro;
8) controllare periodicamente i filtri della cappa;
9) mantenere con attenzione ben pulito l'incubatore a 37°C (pericolo miceti).

Piastre di coltura:
Sono in polistirene, biologicamente inerti e resisti a numerose sostanze chimiche.
Alcuni articoli possono essere rivestiti con proteine della matrice extracellulare, come collagene tipo I, laminina o fibronectina, in tal modo si facilita la crescita di diversi tipi cellulari quali epatociti, cellule muscolari, epiteliali, nervose.

Incubatore:
Per la crescita, le cellule richiedono un pH del mezzo compreso tra 7.2 e 7.4, e per mantenerlo costante si usano incubatori con una fase gassosa contenente il 5% di CO_2.
Con il proliferare della crescita cellulare, in incubatore al 5% di CO_2, il terreno tenderà al giallo a causa dell'acidificazione prodotta dal metabolismo cellulare.
Se le piastre tenute in incubatore, invece, virano al violaceo, significa che la regolazione della CO2 del macchinario è errata oppure che le cellule stanno morendo, non sono metabolicamente attive.
Come indicatore si usa il rosso fenolo, questo prende una colorazione rosso-arancio a pH 7.3, una rosso viola a pH alcalino, e una giallo-arancio a pH acido.
I terreni liquidi non contengono antibiotici, siero e L-glutamina, perché molto instabili, quindi vanno aggiunti prima dell'uso.
Il siero è una miscela complessa di proteine plasmatiche, fattori di crescita, minerali, etc.
Il siero di uso più comune nelle colture cellulari è il siero fetale di bovino o vitello (FBS o FCS).

Crescita delle colture:
Le colture si distinguono a seconda che le cellule siano in sospensione o aderenti.
Le cellule di origine emopoietica, che normalmente crescono in mezzo fluido, crescono in sospensione e si moltiplicano in vitro senza aderire, mentre le cellule che fanno parte di tessuti solidi crescono in vitro aderendo alla superficie delle piastre da coltura.

Contaminazioni delle colture:
L'ingresso indesiderato di microorganismi nel terreno di coltura è dannoso, in quanto questi competono con le cellule in coltura, che generalmente hanno ritmo di crescita inferiore, e possono secernere sostanze tossiche.
Tipici contaminanti sono batteri, micoplasmi, lieviti, muffe.
In caso di infezione batterica il terreno vira in fretta, acidifica e intorbidisce.
Le infezioni da micoplasmi sono più subdole, in quanto il microrganismo è meno visibile e richiede un paio di settimane per formare colonie visibili.
Per l'assenza di parete cellulare, i micoplasmi non subiscono inoltre l'azione di alcuni antibiotici.

Composizione di un terreno per cellule animali:
Le cellule degli organismi pluricellulari non sono adattate ad una vita autonoma e la loro sopravvivenza dipende dalla disponibilità di un numero elevato di sostanze.
I terreni base disponibili in commercio contengono tutti i componenti nutritivi necessari alla crescita delle cellule: amminoacidi, vitamine, sali, glucosio, antibiotici, indicatore, siero fetale di bovino o vitello (FCS).
I più comuni terreni base di coltura sono:

- MEM: Minimum Essential Medium;
- DMEM: Dulbecco's modificaton of MEM.

Questi due differiscono tra loro per il contenuto in amminoacidi e sali, e per la concentrazione di glucosio.
La composizione esatta dei singoli terreni ed il tipo di terreno adatto per una data linea cellulare viene di solito specificato dalla ditta produttrice.

Il siero è molto ricco di proteine, ormoni ed elettroliti.
Permette l'adesione e la propagazione cellulare, infatti contiene ormoni, fattori di crescita e altri messaggeri molecolari che stimolano la vitalità e la proliferazione delle cellule e frenano l'apoptosi.

Consente poi la detossificazione da sostanze tossiche e stabilizzazione di componenti instabili, contiene infatti enzimi detossificanti, proteine di trasporto come transferrina e albumina, oligonutrienti.
Ha anche funzione di protezione immunitaria, contiene anticorpi che riducono l'incidenza di infezioni da parte di virus e altri parassiti microbici, anche se per lo più queste molecole vengono inattivate al calore in modo da evitare che danneggino le stesse cellule.
Il siero più utilizzato è quello bovino, specialmente quello fetale (FCS o Fetal Calf Serum oppure FBS o Fetal Bovine Serum).
L'uso del siero è controverso, generalmente si preferisce il siero fetale in quanto contiene meno anticorpi.
Svantaggi nell'usarlo sono:

- possibile tossicità degli anticorpi;
- variabilità da lotto a lotto;
- inibitori metabolici;
- fattori di crescita che favoriscono alcuni tipi cellulari rispetto ad altri.

PASSAGGI IN COLTURA TISSUTALE PRIMARIO

La cultura primaria contiene una popolazione molto eterogenea di cellule, i passaggi da seguire per poterla ottenere sono:

1) Isolamento del tessuto;
2) Disgregazione delle cellule – inizio della coltura;
3) Incubazione e crescita.

Le celle possono essere autorizzati a migrare da un espianto, e la dissociazione cellulare può avvenire per via meccanica o enzimatica.

CELLULE PRIMARIE E LINEE CELLULARI

I due tipi principali di cellule utilizzate nei laboratori sono cellule primarie e linee cellulari stabilizzate.
Le cellule primarie, note anche come cellule finite, sono cellule che sono direttamente preparate dai tessuti di un organismo, queste mantengono la maggior parte delle caratteristiche del tessuto originale da cui essi derivano.
Se coltivate sotto le giuste condizioni, le cellule primarie cresceranno e proliferano, ma sono solo in grado di farlo un numero finito di volte.

Subcolture e linee cellulari:
Le colture primarie derivano direttamente da tessuti dell'organismo, quando la proliferazione ha depauperato il mezzo di coltura, è necessario provvedere ad una subcoltura in un nuovo recipiente con terreno fresco.
Cellule di colture primarie possono essere trasferite dalla piastra (sub-coltivate) e utilizzate per generare colture secondarie e terziarie, etc.
Quando la proliferazione ha depauperato il mezzo di coltura, è necessario provvedere ad una subcoltura in un nuovo recipiente con terreno fresco.
Ogni volta che le cellule si passano in una coltura prima queste iniziano a proliferare e occupano tutto lo spazio a disposizione, quando tale spazio è totalmente occupato, allora si fanno colture secondarie, terziarie, etc.
Con una spatola, trattando le cellule con tripsina che induce lo staccamento, si possono porta in un altro mezzo di coltura dove possono rioccupa tutto lo spazio a disposizone.
Tutto ciò ha un limite però, le condizioni prima di tutto devono esse sterili, e se le cellule sono mobilizzate vanno centrifugate e poi ripiastrate.
Quando tutta la piastra è coperta di cellule, si dice che queste sono andate a confluenza.

Confluenza:
Quando la superficie della piastra appare "coperta" da cellule, la confluenza ottimale per piastrare le cellule in un'altra piastra è quella dell'80%.
Una confluenza troppo bassa può indicare che le cellule sono in fase lag, non proliferano bene.
Mentre una confluenza troppo alta può comportare che le cellule possono aver modificato le loro caratteristiche.

Lag phase = periodo di adattamento durante il quale le cellule rimpiazzano gli elementi del glicocalice persi durante la tripsinizzazione e che servono per l'attacco ottimale al substrato e la loro diffusione in piastra.

Il glicocalice è una struttura extracellulare che ricopre la superficie esterna dei tessuti, è costituito da carboidrati legati covalentemente alle proteine o ai lipidi di membrana.
La parte più esterna del glicocalice è composto prevalentemente da glicosaminoglicani (GAG), mentre la zona amorfa, più vicina alla membrana cellulare, è costituita da molte glicoproteine.
Vi sono inoltre numerosi GAG che vanno a coniugarsi con proteine, formando proteoglicani, o lipidi, formando glicolipidi.
Questo protegge la cellula e fornisce punti di ancoraggio ai recettori per il riconoscimento delle molecole segnale, quindi è fondamentale per la comunicazione e il riconoscimento cellulare.

CELLULE "NORMALI"

Le colture primarie hanno il problema che dopo un po' le cellule muoiono, ma hanno anche diversi vantaggi, ad esempio riescono a mantenere le strutture del tessuto di origine.
La loro durata di vita dipende dal tipo di cellula e dalla specie, alcune cellule durano un po' di giorni, e arrivano a fare anche 500 replicazioni, altre meno.
Si può vedere quando le cellule iniziano a soffrire, poiché iniziano a cambiare forma, cambiano aspetto.
Quando queste cambiano forma si dice che vanno verso una senescenza replicativa, ovvero stanno smettendo di replicarsi, le cellule iniziano a diventare più grandi.

È stato stabilito un limite di durata per ogni tipo cellulare, il limite di Hayflick, dopo di che le cellule di quel tipo vanno contro senescenza replicativa.
Ad esempio, mettendo in coltura i fibroblasti umani si può osservare:

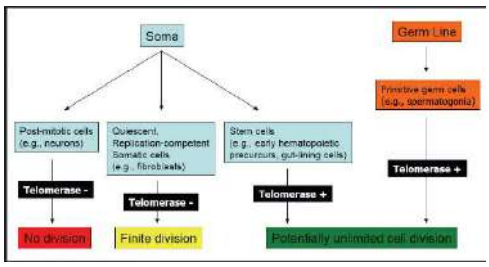
1) fase 1: le cellule iniziano a replicarsi andando a rivestire la piastra in cui sono contenute;
2) fase 2: si replicano fino ad arrivare a confluenza, si fanno subcolture, ma la divisione inizia a rallentare;
3) fase 3: smettono di dividersi, diventano più grandi e o muoiono o vanno in quiescenza.

Dopo la fase 3 non si può più ripristinare la replicazione.
Le cellule senescenti perdono la loro morfologia originaria, sono più grandi rispetto alle loro controparti normali, hanno anche un citoplasma più appiattito che contiene molti vacuoli e filamenti citoplasmatici, un grande nuclei e nucleoli, sono talvolta multinucleate.
In alcuni casi, le cellule senescenti mostrano un aumento del numero dei lisosomi e del golgi.

Un biomarker identifica le cellule senescenti in coltura e nei tessuti che invecchiano in vivo.
Il marcatore di senescenza più comunemente usato è associato al β-gal (SA-β-Gal).
Un enzima catalizza l'idrolisi dei β-galactosidi in monosaccaridi solo in cellule senescenti.
Questi kit vedono ad esempio l'accmulo di β-galattossidasi dentro i lisosomi, è un test citochimico che usa X-GAL come substarto cromogenico, quindi le cellule in scenescenza saranno azzurre, e vuol indicherà che la coltura sta per finire la sua attività.
Il β-galattosidasi kit di colorazione senescenza è progettato per rilevare l'attività β-galattosidasi a pH 6, una nota caratteristica delle cellule senescenti, che non si trova in pre-senescenti, quiescenti o cellule immortali.
La limitata capacità di replicare è una caratteristica della maggior parte delle cellule normali, e culmina in senescenza, uno stato arrestato in cui la cellula rimane vitale.
Le cause di tale fenomeno sono:

- danni da radicali liberi, le cellule essendo in coltura e non nel loro ambiente naturale risentono di uno stress ossidativo;
- erosione dei telomeri, questi si riducono di dimensione, e la cellula percepisce che può essere rischioso dividersi ancora, perché possono verificarsi delle alterazioni.

La replica potenziale di cellule umane normali:
Nell'uomo si ha una linea somatica e una germinale.
Nella linea somatica, le cellule nervose hanno una telomerasi inattiva, non si dividono, così come anche i fibroblasti che si dividono poco e poi smettono.
Ci sono poi delle cellule che invece mantengono la telomerasi attiva, sono le cellule staminali, che continuano a dividersi, così com'è attiva anche la telomerasi nelle cellule staminali embrionali.



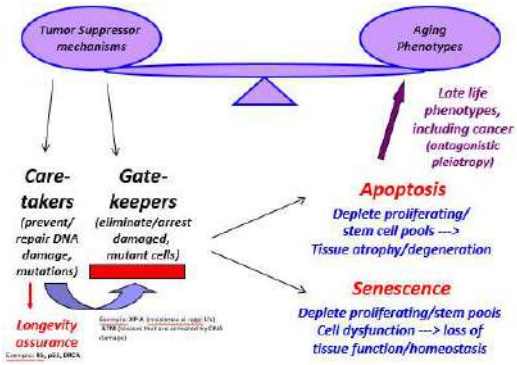
Le cellule della linea germinale, hanno ovviamente la telomerasi attiva, come le cellule staminali.

In sintesi a livello di organismo la senescenza replicativa è il primo processo che sta alla base dell'invecchiamento, dopo un numero di generazioni la crescita cellulare si arresta.
C'è una sorta di "orologio biologico" che dipende dalla specie da cui le cellule sono state prelevate, dalla storia naturale dell'individuo e dalla genetica, come dimostrano le sindromi progerioidi.

Sindromi progerioidi = sono sindromi in cui è presente un invecchiamento precoce.
I bambini a 10 anni appaiono già vecchi e muoiono in età giovanile di malattie tipiche dell'invecchiamento.
Ciò è causato da difetti presenti nei sistemi di riparazione del DNA, quindi in generale le gravi deficienze di proteine implicate nella riparazione del DNA accelerano l'invecchiamento perché possono indurre apoptosi o senescenza.

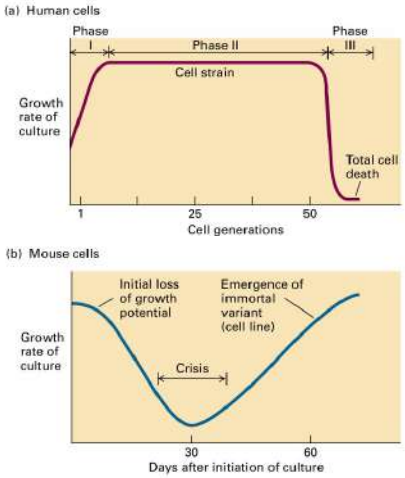
Quando la senescenza replicativa colpisce le cellule staminali difetta la riparazione tissutale e quindi nei tessuti, vi è l'impossibilità di rimpiazzare le cellule usurate dal tempo.
Inoltre le cellule senescenti producono fattori che disturbano il normale trofismo cellulare.
L'invecchiamento dell'intero organismo e la senescenza cellulare sono una sorta di barriera contro la formazione del cancro, infatti la senescenza replicativa e il cancro sono mutualmente esclusivi, cioè se la cellula va in senescenza non può diventare cancerosa.
Una cellula in cui vi è qualcosa che non funziona o va in apoptosi o arresta la sua crescita e questo impedisce la trasformazione neoplastica.

Soppressione del cancro-invecchiamento:
Ci sono una serie di geni deputati a riparare e prevenire eventuali danni al DNA.
Ci sono delle chinasi, dei geni, che si attivano a seguito di questi danni.
Sono geni che quando si attivano danno innesco all'apoptosi o alla senescenze, è infatti la funzionalità di questi geni che assicura la durata della vita.



Se qualche cellula sfugge all'apoptosi o alla senescenza, questa può andare incontro a mutazioni, e quindi anche alla formazione di cancro.
Mutazioni di questi geni che controllano il tutto favoriscono la possibilità che cellule sfuggano ai controlli e quindi aumentano l'incidenza di tumori.
Quello che si vede in vitro è qualcosa che succede spontaneamente anche nell'organismo.

Se mettiamo cellule umane in piastra, queste crescono (fase 1), dopo un po' sarà necessario fare una subcoltura (fase 2), si arriverà infine ad una diminuzione della divisione fino alla fine della coltura (fase 3).
Questo andamento è diverso a seconda delle specie però.
Già nel topo si ha un comportamento diverso dei fibroblasti in coltura in confronto a quelli umani.
Questi quando vengono messi in coltura, si ha la morte della maggior pare (periodo di crisi), quelli che rimangono iniziano poi ad aumentare di numero, e da questi vengono fuori linee cellulari immortalizzate, che sono sempre in divisione e non si ha più quindi senescenza replicativa.
Se si vanno ad analizzare queste cellule che si dividono, si vede che sono cellule mutate.



Crisi = shock dovuto alle condizioni di coltura.

Se nelle cellule di topo la transizione dallo stato normale ad una linea cellulare immortalizzata avviene spesso in maniera spontanea, in altre specie, uomo incluso, questo non avviene facilmente e, per ottenere linee cellulari immortalizzate possono essere necessarie procedure speciali.

Queste cellule di topo in vitro non risentono dei controlli del ciclo cellulare, sono azzerati, e la maggior parte delle cellule, inclusi i fibroblasti, hanno ancora telomerasi attiva.
Se si vogliono avere linee immortalizzate anche nell'uomo, invece, o si prendono cellule tumorali, o si agisce su componenti che agiscono sul ciclo replicativo, si trasformano geneticamente le cellule della colture primaria con trattamenti chimici, o inserendo degli oncogeni virali.

LINEE CELLULARI STABILIZZATE IN CELLULE UMANE

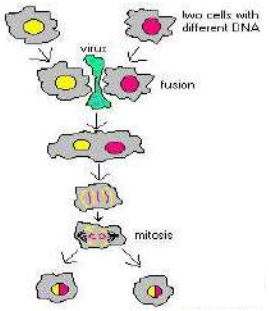
Quello che si può fare per stabilizzare queste cellule è:

1) fusione cellulare: fondere le cellule "normali" con una linea cellulare già immortalizzata;
2) trasfezione di oncogeni virali: virus che promuovono la formazione di tumori, e/o si può modificare geneticamente la riattivazione della telomerasi;
3) inattivare il p53 o il retinoblastoma: inattivando così i controllori maggiori del ciclo cellulare.

1) Fusione con un'altra linea cellulare già immortalizzata:

Può essere mediata da virus dotati di involucro lipoproteico simile alla membrana plasmatica, oppure facilitata da glicole polietilenico che favorisce l'adesione e la fusione delle membrane.

Dopo di che il genoma di queste cellule si fonde insieme, da cellule ibride.



Tali cellule ibride sono immortalizzate.

3) Inattivazione dei punti maggiori di controllo (p53 e pRb):

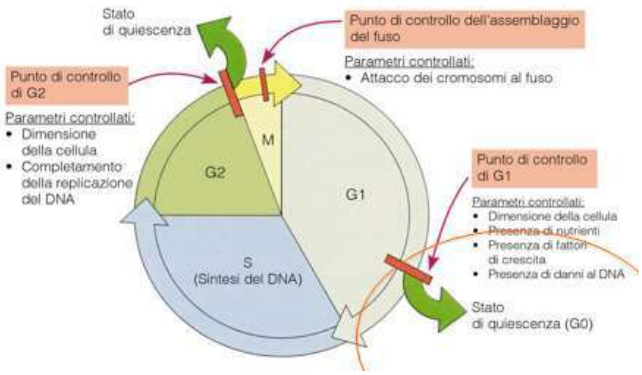
Ci sono diversi punti di controllo tra le fasi del ciclo cellulare che assicurano che la cellula soddisfi i requisiti appropriati per passare alla fase successiva.

Il primo punto di controllo si trova alla fine del G1, noto come punto di restrizione, che permette alle cellule di impegnarsi per la divisione cellulare.

Il secondo è in fase S ed è lì per controllare la qualità del DNA replicato e per determinare se eventuali meccanismi di riparazione del DNA devono essere attivati.

Il terzo punto di controllo è dopo G2, e il suo scopo è, di nuovo, di garantire che il DNA è stato replicato completamente e che sia intatto.

Infine, vi sono diversi controlli all'interno della mitosi per garantire che la cellula è in una posizione corretta per completare la divisione cellulare, cioè citochinesi.



Ci sono varie molecole che sono preposte al controllo delle fasi del ciclo cellulare, molecole come cicline, chinasi ciclina-dipendenti (CDK) e inibitori CDK.

Generalmente, le cicline si legano a CDK per formare complessi che sono poi in grado di spostare la cellula da una fase del ciclo a quella successiva.

Queste cicline vengono create e distrutte per tutto il ciclo cellulare ed i loro livelli possono aiutare a determinare approssimativamente in quale fase del ciclo della cellula si è.

Gli inibitori CDK, come suggerisce il nome, possono legarsi a questi complessi ciclina-CDK e impedire loro di avviare la fase successiva del ciclo.

La proteina p53, è un soppressore del tumore, ed è anche di vitale importanza sia per il ciclo cellulare che per immortalizzare le cellule.

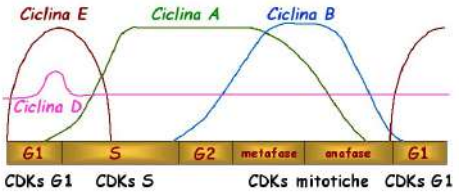
Questa entra in gioco ai checkpoint dopo G1 e G2, e se vi è un danno del DNA induce la trascrizione dell'inibitore p21 Cdk, che impedirà l'attivazione del complesso G1 ciclina-Cdk.

Inibendo p53 si permette al ciclo cellulare di progredire e continuare a proliferare, causando così l'immortalizzazione cellulare.

I sistemi di controllo possono arrestare il ciclo cellulare in punti di controllo specifici, hanno una sequenza temporale appropriata, un ordine corretto degli eventi, eventi che avvengono solo una volta per ogni ciclo cellulare.

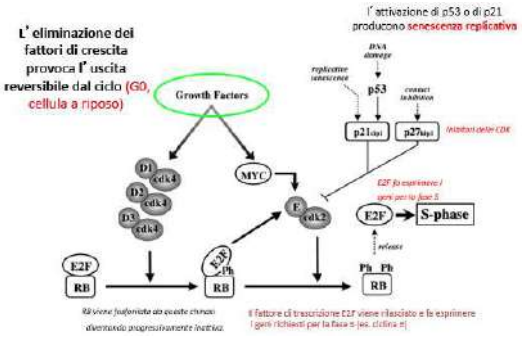
Il punto di restrizione è un importante punto di controllo dei mammiferi, nella fase G1 tardiva, che impegna la cellula ad entrare nella fase S.
In questo momento la cellula integra il proprio programma genetico con i segnali che provengono dall'ambiente extracellulare, i fattori di crescita.
G1 è l'unica parte del ciclo cellulare dipendente da fattori di crescita che regolano i livelli di ciclina D.

Il cuore del sistema di controllo del ciclo cellulare è rappresentato dalle chinasi ciclina dipendenti (CDK).
Nei mammiferi le cicline sono 9, di cui le cicline D ed E vengono espresse durante le fasi G0/G1.



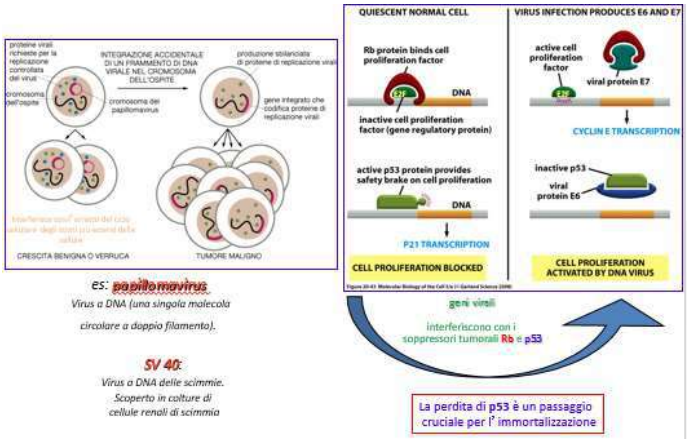
Le CDK sono legate e attivate dalle cicline, quando la concentrazione della ciclina è bassa la chinasi ciclina-dipendente corrispondente si trova priva della subunità ciclina ed è perciò inattiva, si attiva sol quando l'espressione della ciclina aumenta.
Le cicline di tipo D sono espresse in risposta alla stimolazione con fattori di crescita, e si legano con la loro chinasi-dipendente, questa chinasi fosforila una proteina che è il retinoblastoma, una proteina che porta, quando non è fosforilata, un fattore di trascrizione, E2F, essenziale per far esprimere i geni essenziali per la fase S.
In cellule che proliferano di continuo il loro livello è molto meno variabile durante il ciclo cellulare se comparate con i livelli intracellulari delle cicline E, A o B1.

Il punto di restrizione del ciclo cellulare e il gene oncosoppressore Rb:
Gene oncosopressore: la sua mutazione è associata alla formazione del retinoblastoma nei bambini (1:20 000 sotto i 3 anni).
Si attivano contemporaneamente la ciclina D ed E, le quali favoriscono entrambe la fosforilazione del retinoblastoma.
Tutto ciò produce la liberazione completa del fattore E2F, che fa esprime i geni della fase S.
Avviene anche il controllo della situazione del DNA per controlla se ci sono stati degli eventuali danni genotossici.
Se c'è stato un danno al DNA o se le cellule non sono in condizioni ottimali, o se c'è un'inibizione di contatto, allora si attiva p53.
Uno dei principali target di p53 è p21, una proteina che blocca la replicazione del DNA, inibendo la produzione e l'espressione delle chinasi.



Questo controllo blocca l'attività della ciclina D ed E, e blocca quindi il rilascio del fattore E2F.

2) Virus che promuovono la formazione di tumori:
Trasformano le cellule di mammifero interferendo con i controlli del ciclo cellulare.
Un esempio sono il papillomavirus, questo interferisce con l'arresto del ciclo cellulare degli strati più esterni delle cellule per permettere la replicazione del suo genoma, formando così le "verruche".
Questi sono dei virus che non si integrano nel genoma, ma che costringono comunque la cellula a replicarsi, anche quando non lo farebbe.

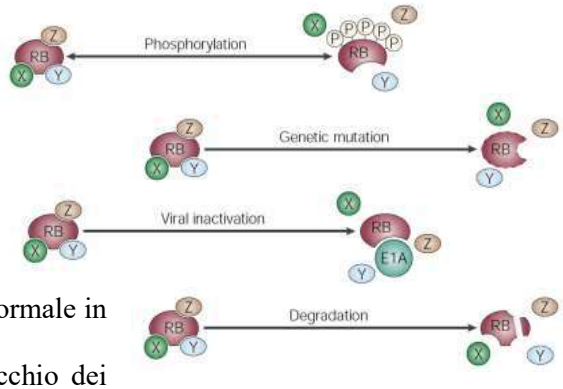


Ci sono dei membri della famiglia del papilloma che sono più lesivi, in questo caso si integrano nel genoma, e prendono il controllo completo della replicazione della cellula facendola diventare una cellula tumorale.
Interferiscono con il ciclo cellulare producendo proteine che interferiscono con quelle normali del ciclo cellulare.
La proteina virale E7, ad esempio, va a legarsi con il retinblastoma, E2F si ritrova libero, e quindi può attivare i geni d'attivazione della fase S, anche se la cellula non è in condizioni ottimali.

La proteina virale E6, invece, blocca p53 che non può più attivare la produzione di p21, quindi la cellula continuerà a dividersi anche in condizioni non ottimali piuttosto che andare in apoptosi.
A causa delle proteine virali le cellule si dividono sempre, anche se hanno accumulato danni o mutazioni, producendo così il tumore.

Meccanismi di inattivazione:

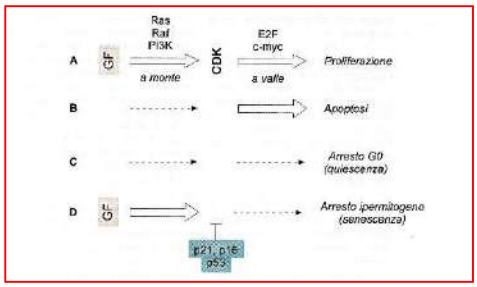
- RB è fosforilata;
- Il gene RB è mutato, ad esempio retinoblastoma;
- RB è sequestrata da oncoproteine virali, ad esempio papillomavirus → E7;
- RB è degradata da enzimi proteolitici, ad esempio pathway delle caspasi durante l'apoptosi.



In sintesi: il retinoblastoma fosforilato in condizioni normali libera E2F e la sua liberazione porta la cellula normale in fase S.
Se il retinoblastoma è mutato, si ha un tumore nell'occhio dei bambini.
Questo destino tumorale può essere anche dovuto a proteine virali.
Altro aspetto è che il retinoblastoma può esse degradato da enzimi proteolitici di quando la cellula va in apoptosi.

Cosa può succedere quindi in una coltura cellulare:

A. Si ha una normale cellula che si divide ed è in proliferazione.
B. Se mancano i segnali proliferativi tutto il resto può attivarsi, ma la cellula non è cresciuta e non si sono attivate le cicline corrispondenti, capisce quindi che c'è un danno e va incontro ad apoptosi.



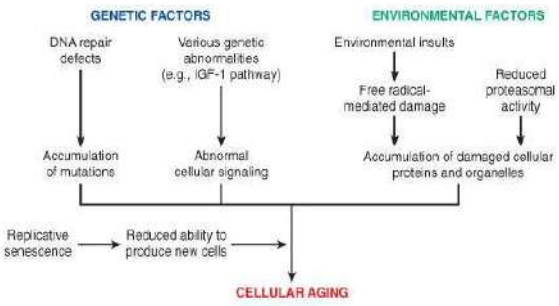
C. Le cellule hanno un arresto in G0, che è un arresto temporaneo dovuto a mancanza di fattori di crescita e mutageni, la cellula quindi è quiescente.
Questo è un processo reversibile, inoltre le cellule tumorali non hanno una fase G0.
D. Si ha senescenza replicativa, che è un calmarsi dell'attività replicativa, si hanno cellule grandi ma che non si replicano.

L'induzione degli inibitori delle CDK provocata da :

- danno al DNA;
- stress;
- inibizione da contatto.

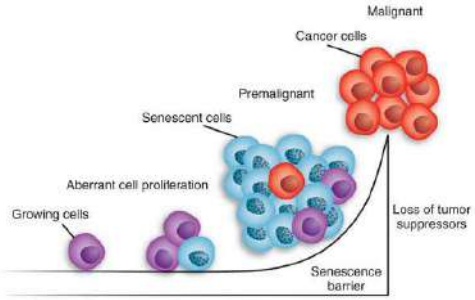
INVECCHIAMENTO CELLULARE ED AGEING

L'invecchiamento può essere dovuto ad accumulo di danni legati a stress, oppure all'esistenza di un orologio biologico, cioè a geni che modulano la longevità.
L'invecchiamento che caratterizza le colture primarie è lo stesso che si ha in vivo nell'organismo.
La presenza di fattori genetici che modulano la longevità è una barriera contro la produzione di tumori, contro un accumulo di mutazioni che possono favorire la formazione di questi.



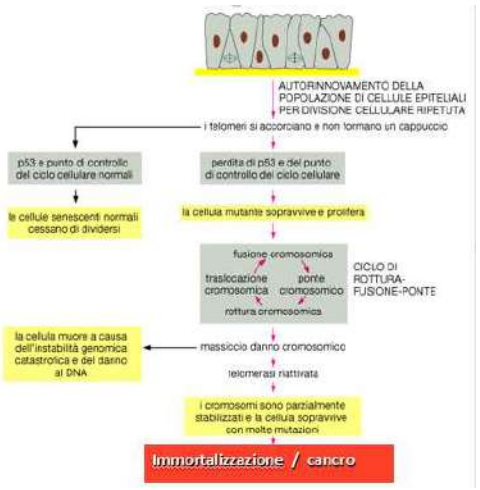
L'anormale attivazione di oncogeni può promuovere una proliferazione cellulare aberrante, che può provocare attivazione di un programma di senescenza (SA-beta-galactosidase activity).
Se questo programma rimane intatto la crescita cellulare può rimanere benigna per anni, ma se delle mutazioni impediscono l'attivazione del programma di senescenza, allora si può attivare la progressione tumorale.

Ci sono ad esempio delle cellule staminali che crescono e producono delle cellule che si riproducono a loro volta e che crescono.
Alcune di queste nel frattempo vanno incontro a senescenza, l'omeostasi di questo tessuto è quindi mantenuta.



Se ad un certo punto una di queste cellule invece di diventare senescente, per una qualche mutazione smette di rispondere ai controlli e riprende a dividersi, diventa una cellula potenzialmente tumorale.
Questa cellula pre-tumora accumola mutazioni fino a diventare un tumore.

Nelle cellule somatiche umane la telomerasi non è attiva, e ad ogni divisione cellulare i telomeri si accorciano.
Si promuove così l'instabilità genomica, e si attivano meccanismi di controllo.
Una mutazione in p53 fa sì che questa cellula perda un punto di controllo fondamentale per la sua replicazione, e quindi continua a prolifera, ma non è tumorale.
Il problema è se prolifera una cellula con accorciamento dei telomeri o altre alterazioni, ciò infatti viene percepito come un danno tale da far morire la cellula.
La cellula muore a meno che tale instabilità non abbia riattivato la telomerasi, in questo caso diventa una cellula immortalizzata che può dare un tumore.



LINEE IMMORTALIZZATE

Le linee cellulare immortalizzate hanno due origini:
1) da tumori;
2) da modificazione genetica di cellule primarie.

Ciò è vero nell'uomo.
Questo tipo di cellule sono più semplici da mantenere, perché ne esistono di molti tipi e con un terreno idoneo si possono conservare.
Servono a molti tipi di studi, sia di base che di ricerca.
La maggior parte di queste cellule non è più diploide ma aneuploide.

A differenza delle cellule somatiche umane, le cellule di topo mantengono la telomerasi attiva e quindi i loro telomeri non si accorciano ad ogni ciclo cellulare.
Molti meccanismi di controllo del ciclo cellulare di queste cellule di topo sono inattivi in coltura.
I topi privi di telomerasi, un'inattivazione del gene quindi, producono tumori in vivo sebbene a frequenza minore, e questo dimostra che l'inattivazione della telomerasi non è l'unico mezzo per sostenere lo stato "immortale", infatti anche i meccanismi di controllo non sono attivi in coltura.

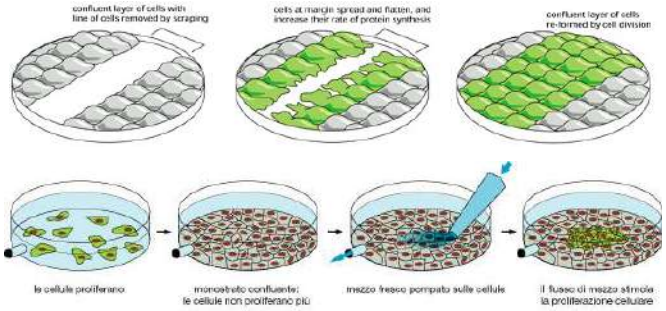
Le prime cellule immortalizzate identificate furono le cellule HeLa, provenienti da un tumore dell'utero.
Queste cellule hanno una capacità replicativa impressionante e sono molto invasive.
Le cellule HeLa sono state coltivate in modo continuo per uso scientifico da quando sono stati prelevati i primi campioni dal tumore di una donna affetta da cancro cervicale nel 1950.
Essi sono stati utilizzati per vari scopi, tra cui lo sviluppo di un vaccino contro la poliomielite, la ricerca di una cura per le malattie come la leucemia e il cancro, e lo studio degli effetti cellulari di farmaci e radiazioni.
Derivano da una donna, Henrietta Lacks, che morì alla John Hopkins University, all'età di trentuno anni.
Un campione di uno dei suoi tumori è stato inviato a George e Maragret Gey che era stato alla ricerca di una linea di cellule umane che sopravvivesse indefinitamente al di fuori del corpo per scopi di ricerca.
È interessante notare che la natura aggressiva delle cellule HeLa in coltura ha portato non solo scoperte scientifiche, ma anche errori sperimentali.
Queste possono facilmente invadere altre colture durante le procedure di trasferimento di laboratorio di routine e avevano contaminato molte altre linee cellulari utilizzate nella ricerca dalla fine del 1960.

Di conseguenza, numerosi articoli di ricerca che sono stati pubblicati sulla base di una varietà di tipi di cellule in coltura sono stati successivamente dimostrati essere cellule HeLa e sono, quindi, stati attualizzati.

Salvo eccezioni sporadiche, le linee cellulari umane usate comunemente sono derivate da tumori.
Alcune linee cellulari possono mantenere caratteristiche differenziative delle cellule originarie, ad esempio C2C12 ed L6 Mioblasti di ratto trasformati.
Questi in coltura, quando si ostacola la loro crescita ad esempio togliendo il siero, tendono a fondersi e a formare miotubi con la caratteristica striatura del muscolo scheletrico.
Dalle colture togliere il siero è come bloccare la fase replicativa, e indurre quindi il differenziamento.
Alcune di queste caratteristiche che si mantengono in queste linee le rendono adatte per studi sul tessuto di origine.

INIBIZIONE DA CONTATTO NELLE COLTURE CELLULARI

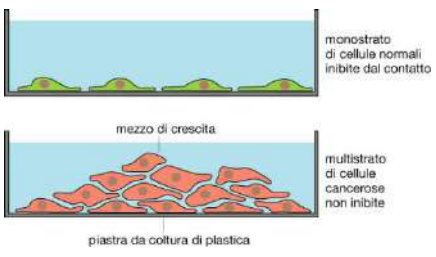
Cellule di mammifero coltivate in presenza di siero aderiscono al fondo della piastra, si allargano e si dividono fino a confluenza.
L'inibizione da contatto dipende dal contatto con la piastra e dal contatto con le altre cellule.
Oltre al problema di questa inibizione si ha anche la competizione per le proteine del siero.
La caratteri fondamenta è che tutte le cellule in colture crescono, quando raggiungono la confluenza del 100% non crescono più perché risentono dell'inibizione da contatto.
Quando le cellule smettono di cresce si può verificare che in prese di siero se si striscia via un po' di cellule, le cellule che sono ai bordi ricominciano a proliferare fino a richiudere questa apertura.



Se invece sono a confluenza, e vi si aggiunge del terreno fresco con siero, si vede che un po' queste ricominciano a cresce, quindi tale blocco oltre che al contatto è dovuto anche alla competizione per nutrienti freschi.

CARATTERISTICHE LINEE CELLULARI IMMORTALIZZATE

Le linee cellulari immortalizzate presentano caratteristiche simili alle colture primarie, come la dipendenza dall'ancoraggio, ovvero le cellule devono potersi attaccare ad una superficie solida, l'inibizione della crescita dipendente dalla densità cellulare, e la crescita dipendente strettamente dalla presenza di siero.
Le linee cellulari tumorigeniche presentano una minore dipendenza dai fattori del siero e minore inibizione da contatto, infatti possono crescere anche in sospensione.
Ci sono delle colture che non sono inibite dal contatto cellula-cellula, queste se gli si dà del terreno fresco, crescono in multistrato poiché non hanno bisogno di ancorarsi al substrato.



Spesso questo tipo di cellule è tumorigenico.
Una linea cellula che deriva da tumore non è necessariamente tumorigenica, ma se lo è quando viene reimpiantata riproduce tumori, mentre quelle tumorali no.
Ora sappiamo che l'adesione cellulare è mediata dai recettori di superficie specifici per molecole nella matrice extracellulare, così sembra probabile che la diffusione può essere preceduta dalla secrezione di proteine della matrice extracellulare e proteoglicani.
La matrice aderisce al substrato, e le cellule quindi si associano alla matrice attraverso recettori specifici.
Quindi, vetro o plastica, che sono stati condizionato da crescite cellulari precedenti, possono fornire spesso una migliore superficie per il fissaggio, e substrati pretrattati con costituenti della matrice, come fibronectina o collagene, oppure derivati, quali gelatina, aiuteranno le cellule più esigenti a fissarsi e proliferare.

Una linea cellulare immortalizzata non è necessariamente tumorigenica in vivo, il processo di formazione di un tumore, in vivo è infatti graduale e richiede una serie di mutazioni.

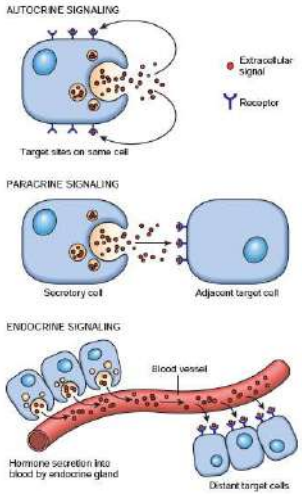
Le mutazioni che possono portare alla trasformazione di una cellula riguardano generalmente queste categorie di geni:

- sopravvivenza cellulare;
- proliferazione;
- apoptosi;
- stabilità genomica;
- angiogenesi, formazione di nuovi capillari, non richiesta per la proliferazione in coltura;
- invasività, non richieste per la proliferazione in coltura.

L'assenza di alcune di queste mutazioni spiega perché cellule trasformate in coltura possono non essere tumorigeniche, ovvero in grado di produrre un tumore solido in vivo.
Cellule in coltura che sono in grado di replicarsi indefinitamente sono senza dubbio mutate in alcuni geni, ma non necessariamente possono produrre un tumore se impiantate in vivo, in quanto richiederebbero in tal caso alcune mutazioni non richieste per la proliferazione in vitro, come ad esempio la neoangiogenesi, la capacità di far crescere capillari per ottenere nutrimento, oppure l'invasività.

Le cellule degli organismi multicellulari hanno bisogno di segnali per capire come devono comportarsi, quindi quando sono in coltura, in ambiente artificiale, questi segnali devono comunque essere forniti, e vengono forniti attraverso il siero.
Le segnalazione in vivo può essere:

- La comunicazione autocrina: si verifica quando la cellula bersaglio è la stessa cellula di segnalazione, è una strategia molto usata da alcune cellule tumorali;
- La comunicazione dipendente da contatto: si verifica quando le molecole di segnalazione si trovano sulla superficie di una cellula e segnalano alle cellule bersaglio legandovisi senza abbandonarla;
- La comunicazione paracrina: si verifica quando la molecola di segnalazione agisce a brevissima distanza su cellule bersaglio diverse poste presso la cellula di segnalazione;
- La comunicazione endocrina: si verifica quando la molecola di segnalazione, spesso trasportata dal sangue, agisce su una cellula bersaglio posta a grande distanza, è un tipo di segnalazione relativamente lenta;
- La comunicazione sinaptica: è molto veloce.



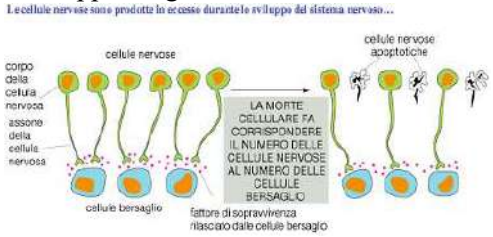
CONTROLLO EXTRACELLULARE DEL CICLO CELLULARE

Mitogeni/Fattori di crescita:
Molti tipi di mitogeni stimolano la divisione cellulare.
In coltura le cellule proliferano in presenza di siero, ma non in presenza di plasma.
Il plasma è parte non corpuscolata del sangue, mentre il siero è la parte liquida dopo la coagulazione del sangue, quando le piastrine hanno rilasciato il loro contenuto secretorio.
PDGF è un fattore di crescita derivato dalle piastrine, è il principale gruppo di mitogeni sierici per le cellule di origine mesenchimale nell'uomo.
Si pensi al caso in cui il tessuto subisca un trauma quale una lacerazione, il primo fenomeno è appunto la formazione di un coagulo veicolato dalle piastrine, in termini più specifici la formazione del coagulo avviene poiché le piastrine rilasciano PDGF il quale, grazie alle sue proprietà chemiotattiche, richiama cellule quali i macrofagi che, con la loro attività fagocitica, eliminano le cellule morte venutesi a accumulare a livello del trauma.
Nel contempo il PDGF richiama anche cellule quali i fibroblasti i quali vengono spinti alla proliferazione in loco dal PDGF stesso, i fibroblasti andranno quindi a sostituire le cellule morte rigenerando così il tessuto.
Sebbene PDGF è sintetizzato, memorizzato nei granuli alfa delle piastrine e rilasciato su attivazione, viene prodotto anche da una pletora di cellule muscolari lisce, macrofagi attivati, e cellule endoteliali.
PDGF è un fattore di sopravvivenza principale che inibisce l'apoptosi e promuove la proliferazione.
Tutti i tipi di PDGFs e PDGF-recettore possono partecipare alla proliferazione di diversi tipi cellulari con cascate di MAPK.
Altri mitogeni/Fattori di Crescita:

- Fattore di crescita epidermico: EGF;
- Fibroblasti fattore di crescita: FGF;
- Nerve growth factor: NGF;
- Bone proteine morfogenetiche: BMPs;
- Epatociti fattore di crescita: HGF.

Se le cellule proliferassero senza crescere diventerebbero sempre più piccole, i segnali infatti regolano anche le dimensioni di una cellula.

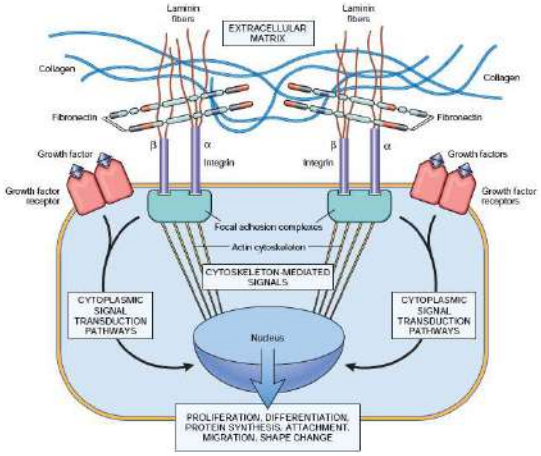
Fattori di sopravvivenza/mantenimento:
Questi prevengono la perdita di identità, la degenerazione e l'atrofia cellulare durante lo sviluppo e nella vita adulta, un esempio di questi fattori sono le trofine.
Possono avere anche attività mitogene.
I fattori di sopravvivenza sono fattori che reprimo l'apoptosi.
Le neurotrofine sono una famiglia di proteine che determinano la sopravvivenza, lo sviluppo e la funzione dei neuroni.
Esse appartengono a una classe di fattori di crescita conosciute come fattori neurotrofici, tali fattori sono secreti dal tessuto bersaglio e agiscono impedendo al neurone associato di avviare la morte cellulare programmata, consentendo in tal modo ai neuroni di sopravvivere.



L'ancoraggio:
È necessario alla cellula per crescere e proliferare quando è in coltura.
Quando le cellule hanno forma appiattita significa che sono attaccate totalmente al substrato, e la cellula è in G1, il momento in cui si ha influenza esterna dei fattori di crescita.
Durante le altre fasi rimangono attaccate ma in modo minore, e riprendono una forma tondeggiante.
La dipendenza di ancoraggio è mediata da adesioni focali e dai segnali intracellulari che generano e che influenzano l'organizzazione del citoscheletro e il ciclo cellulare.
La forma schiacciata serve per far dividere le cellule.
Si è visto infatti che se si mettono le cellule su uno strato di agar non si dividono, se si fa un foro su questo strato e si riesce ad ottenere un contatto minimo cellula-substrato, solo un minimo numero di cellule riesce a dividersi, se si permette invece alle cellule di aderire totalmente al substrato allora tutte si dividono.

Adesioni focali = sono mediate da proteine eterodimeriche transmembrana, le integrine, che in forma attiva si legano ad actina intracellularmente e a fibronectina extracellularmente, generando segnali intracellulari che fanno progredire il ciclo cellulare da G1 a S.

I componenti della matrice cellulare possono regolare la proliferazione cellulare mediante segnalazione attraverso i recettori cellulari.
Le integrine legano i componenti della matrice cellulare e interagiscono con il citoscheletro a complessi di adesione focale.

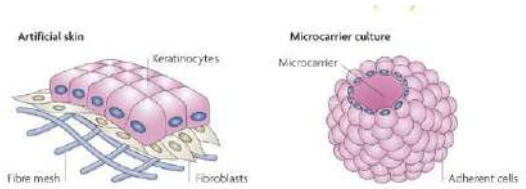


La cellula fa questo perché oltre al controllo che arriva dal siero della coltura, c'è anche un controllo che avviene attraverso il citoscheletro.
Il contatto con la matrice cellulare serve per mandare altre segnalazioni.
Il controllo è quind un contro duplice: fattori di crescita e citoscheletrico.
Entrambi questi controlli avvengono dall'esterno, è l'unico momento in cui la cellula ha questo rapporto con l'esterno.
A determinare la capacita di replicarsi e sopravvivere no dipende tanto dal numero delle cellule della matrice che la cellula contatta, ma quanto dalla possibilità che questa ha di potersi allargare sul substrato.

Colture in monostrato/colture in sospensione:
Generalmente le cellule quando crescono tendono ad aderire alla superficie del recipiente di coltura, e questa adesione è richiesta come segnale di sopravvivenza, e moltiplicandosi le cellule formano uno monostrato, in quanto risentono dell'inibizione da contatto.
Questo non vale per le cellule trasformate che possono formare anche colture pluristratificate.
Le colture in sospensione contengono cellule che possono proliferare senza una superficie di adesione, e questa capacità può essere usata in vitro come test per riconoscere sostanze cancerogene.

Le cellule richiedono una superficie di attacco in vitro così come in vivo, ad eccezione delle cellule del sangue e delle cellule trasformate che possono non richiedere adesione al substrato.
Tuttavia le cellule normali nel corpo umano hanno esperienza di un ambiente tridimensionale, completamente circondato da altre cellule, membrane, strati fibrosi e proteine di adesione.
Si stanno utilizzando impalcature tridimensionali che possono riflettere la normale morfologia delle cellule e il comportamento più realistico della biologia cellulare e delle interazioni intercellulari, ovvero colture cellulari 3D.
Perline derivate da destrano, gelatina, glicosaminoglicani e altri polimeri porosi possono essere utilizzate come supporto 3D per la cultura di cellule ancoraggio-dipendenti.
Le cellule coltivate in 2D possono differire molto da quelle cresciute in 3D per:

- morfologia;
- interazioni cellula-cellula;
- interazioni cellula-matrice;
- capacità di differenziamento.



Ingegneria Tissutale:

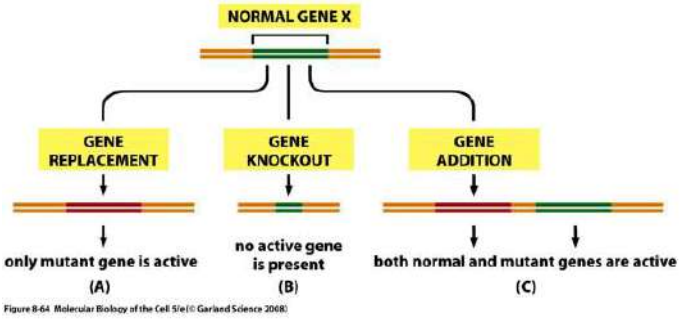
Supporto tridimensionale = Biomateriale;
Stampa 3D, si riferisce ai processi utilizzati per creare un oggetto tridimensionale in cui si formano gli strati successivi di materiale sotto il controllo del computer per creare un oggetto.

Componente biologica = Cellule;
3D bioprinting, è il processo di creazione di modelli cellulari in uno spazio confinato utilizzando tecnologie di stampa 3D, in cui la funzione e la vitalità cellulare sono conservati all'interno del costrutto di stampata.

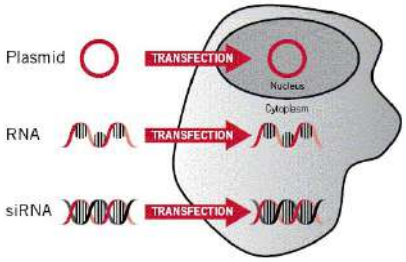
L'obiettivo finale è quello di azzerare le liste di attesa per i trapianti, fegato, reni e cuore, potrebbero essere pronti in pochi giorni, realizzati con cellule del paziente grazie a una stampante 3D.
Nel giro di qualche decennio potrebbe essere realtà, per ora il bioprinting, l'idea di stampare con materiali a base di cellule, sta muovendo i primi passi, ma sia gli analisti di mercato sia gli esperti di tecnologia scommettono sulla sua rapida ascesa.
Il bioprinting 3D è un campo competitivo in questo momento, con le aziende e ricercatori di tutto il mondo a gara per mettere a punto una tecnologia perfetta che permetterà la stampa 3D per i trapianti di organi e altre procedure di salvataggio impensabili fino a poco tempo.
Ormai non è più una questione di se queste procedure diventeranno realtà, ma solo di quando.
"Inizialmente useremo le stampanti 3D per fare arti artificiali ma con il tempo potremo sviluppare un maggior numero di prodotti medici avanzati grazie alle cellule staminali-stampate in 3D".

La società svedese Cellink, specializzata nel bioprinting 3D, ha appena annunciato il rilascio della sua ultima bio-stampante 3D: la BIO X.
Il nuovo bioprinter 3D che sarà messa in vendita a circa 39.000 €, costo che comprende i bioinks (inchiostri biologici), software, accessori e materiali di consumo.
BIO X può stampare in una vasta gamma di biomateriali, compreso il cuore, pelle, cartilagine, o tessuti ossei.
In termini di caratteristiche, la BIO X possiede, testine di stampa intelligenti intercambiabili dall'utente, che sono in grado di raffreddare e riscaldare il materiale biologico, e gli utenti saranno in grado di scegliere tra una gamma di metodi di estrusione per ottimizzare i diversi inchiostri biologici a seconda del tessuto che devono stampare.
BIO X offre anche il controllo della temperatura del letto di stampa, caratteristica che aumenta sensibilmente il numero di biomateriali che possono essere stampati in 3D sulla macchina.

TECNOLOGIE TRANSGENICHE



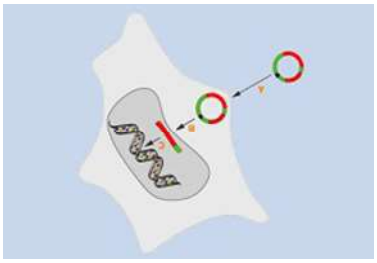
Modifica il genoma significa inserire degli acidi nucleici, i quali possono arrivare al nucleo, oppure si può andare a modificare il trascrittoma, intervenendo con degli RNA estranei, RNA messaggeri, antisenso, o piccoli RNA.
La trasfezione è il processo di introduzione di acidi nucleici nelle cellule eucariotiche.
Questa tecnica può avere varie applicazioni:



- analizzare la funzione di un gene;
- studiare i meccanismi di regolazione genica;
- produrre prodotti genici ricombinanti;
- animali transgenici;
- terapia genica.

I metodi per poter attuare tale processo possono essere:
1) Cavallo di Troia: si imbroglia la cellula permettendo al materiale esterno di attraversare la membrana, co-precipitazione, si usa ad esempio DEAE solfato destran, fosfato di calcio, liposomi;
2) SWAT team: forza bruta, si aprono dei pori nelle cellule in modo da far entrare il materiale estraneo, ma si deve fare attenzione a non applicare un metodo troppo violento, altrimenti la cellula potrebbe morire, si possono usare metodi come elettroporazione, gene gun, microiniezione;
3) Biologica Warfare: attacco biologico, si può usare un'infezione con virus ricombinanti, si usano quindi i virus come dei vettori.

Nucleofezione:
Può essere considerata una variante dell'elettroporazione, applicando uno specifico voltaggio e reagenti.
Sono stati ottimizzati gli impulsi elettrici e le soluzioni in cui risospendono le cellule, a seconda delle linee cellulari da trasfettare.
Il DNA viene veicolato direttamente nel nucleo, e consente il trasferimento di acidi nucleici nelle cellule dei mammiferi considerati di difficile trasfezione, si ha infatti un'alta efficienza in combinazione con una bassa mortalità.



Tra i vantaggi si ha che è efficace anche con colture primarie.
L'effetto della trasfezione si produce già dopo 3-8 h dal trattamento, l'effetto massimo si ha dopo 16-24 h.
Gli svantaggi invece comprendono il costo del macchinario, il costo dei reagenti, ed il fatto che le soluzioni ottimizzate per ogni linea devono essere acquistate già pronte, cioè protette da brevetto.

ANALIZZARE LA FUNZIONE DI UN GENE

Si è passati dalla genetica classica, che comporta lo studiare i mutanti spontanei per scoprire i geni responsabili della mutazione, alla genetica inversa, che consiste nell'isolare il gene esogeno di interesse, inserire il gene esogeno in un vettore e trasferire il gene esogeno nella cellula.
Con la genetica inversa si può modificare un gene per produrre una proteina alterata, aggiungere un gene per produrre un eccesso di proteina, una proteina nella cellula sbagliata od una proteina in un momento sbagliato, oppure togliere un gene e quindi non produrre una proteina.
Per fare ciò occorrono degli organismi modello, ciascuno dei quali ha delle caratteristiche peculiari, per esempio gli studi su cellule di lievito hanno permesso di capire molto sui sistemi del ciclo cellulare, oppure organismi come idra hanno permesso di studiare la loro forte capacità rigenerativa, o ancora la drosophila che è l'organismo modello per eccellenza su cui si possono andare a studiare le mutazioni, lo zebrafisch che si riproduce con un ciclo che avviene del tutto all'esterno, ed il sistema più vicino all'uomo, il topo.
È più facile traslare i dati ottenuti da un mammifero ad un altro, per questo si usano i topi.

TECNOLOGIE DI GENOMA EDITING

Interruzione genica, addizione genica, correzione genica.

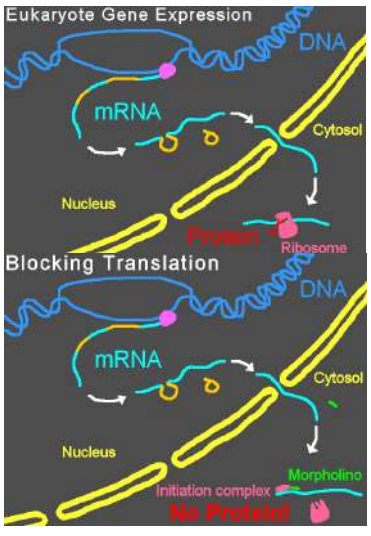
È rappresentata da un nuovo metodo di alterazione, le nucleasi chimeriche.
La nucleasi zinc-finger (ZFNs) e l'attivatore di trascrizione nucleasi effettore (Talens) comprendono una potente classe di strumenti che stanno ridefinendo i confini della ricerca biologica.
Queste nucleasi chimeriche sono composte da moduli DNA-binding programmabili, sequenza-specifiche, legate ad un dominio di scissione del DNA non specifico.
ZFNs e Talens consentono una vasta gamma di modificazioni genetiche del DNA inducendo rotture del doppio filamento che stimolano ad errori, unione di sequenze non omologhe o riparazione omologia-diretto a specifiche posizioni genomiche.
Con la tecnica di addition, si evidenzia il potenziale terapeutico di ZFNs e Talens.
Queste due tecnologie sono stati i precursori di CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas 9:
È già straordinariamente popolare, perché è semplice da usare e potente.
Due gli ingredienti sono un enzima capace di tagliare il DNA, la Cas9 endonucleasi, e una molecola di RNA ogni volta diversa, che guida l'enzima su una sequenza corrispondente nella doppia elica, dove avverrà l'incisione.
Si è partito da un sistema già esistente nei batteri contro le infezioni fagiche.
Questa tecnologia può permettere di modificare qualsiasi punto del genoma in modo molto semplice, e ciò ha fatto scaturire molti problemi etici.
Un autorevole gruppo di scienziati ed esperti di bioetica si è riunito a gennaio 2015 a Napa, in California, per discutere le implicazioni scientifiche, mediche, legali ed etiche.
Un percorso prudente in avanti per l'ingegneria genomica e modificazione genetica germinale.
La tecnologia di ingegneria del genoma offre un potenziale senza precedenti per modificare il genoma umano e non.
Negli esseri umani mantiene la promessa di curare malattie genetiche, mentre in altri organismi fornisce i metodi per rimodellare la biosfera a beneficio dell'ambiente e della società umana.
Tuttavia, con tali enormi opportunità ci sono rischi sconosciuti per la salute umana ed il benessere.

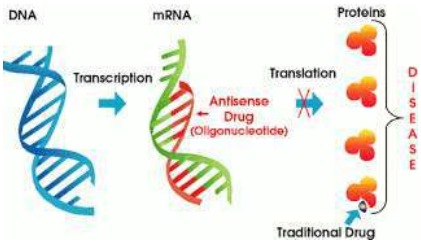
ALTERARE I GENI

Altra possibilità è quella che invece di agire a livello genico con un knockout, e quindi non avere più la produzione della proteina, si va ad agire a livello del trascritto, knockdown, in questo caso qualche traccia di proteina potrebbe restare.
Si identifica un gene per scoprirne la funzione in vivo sulla base dei fenotipi prodotti dalla sua manipolazione.

1) Silenziamento genico post trascrizionale: RNA antisenso, che va a bloccare uno specifico messaggero impedendo la traduzione.
   Ne occorrono grandi quantità, e deve essere prodotto all'interno della cellula in questione altrimenti viene facilmente degradato.

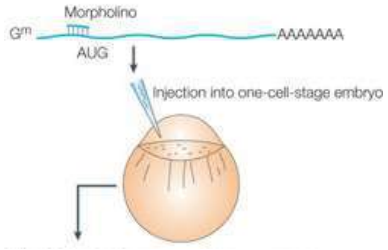


2) Silenziamento genico post trascrizionale: si fanno degli oligonucleotidi con delle basi legate ad anelli di morfolino invece che a deossiribosio e collegati mediante gruppi diversi dai normali gruppi fosfato, tale struttura lo rende capace di legarsi stabilmente all'RNA, ma rende quest'ultimo incapace di legarsi al ribosoma, poiché il morfolino causa un blocco dovuto ad ingombro sterico della traduzione.



Il morfolino è una molecola sintetica che è il prodotto di una riprogettazione della struttura naturale degli acidi nucleici.
Di solito sono 25 basi di lunghezza, che si legano a sequenze complementari di RNA di standard di acido nucleico base-accoppiamento.

Morfolino:
I morfolini non passano bene attraverso le membrane plasmatiche, devono pertanto essere consegnati nel vano nucleare o citosolico per essere efficace.
Gli oligonucleotidi morfolininici sono stabili, non hanno alcuna carica, sono molecole solubili in acqua che si legano a sequenze complementari di RNA, inibendo così l'elaborazione mRNA, e le proteine di legame di tali siti.
I morfolini sono tipicamente utilizzati per inibire traduzione di mRNA, splicing del pre-mRNA, e la maturazione di miRNA, anche se possono inibire altre interazioni tra macromolecole biologiche e RNA.
I morfolini sono efficaci, specifici, e mancano di effetti non antisenso.
Formano coppie di basi stabili con sequenze di acido nucleico complementare, ma a quanto pare non si legano alle proteine in misura significativa.
Questi possono essere progettati per legarsi sia ad AUG e avviare siti codone o splice-giunzione che sono presenti in un mRNA di interesse, che permette al ricercatore di knockdown l'espressione di tutti i trascritti o di una forma splice specifico rispettivamente.
I morfolini sono biologicamente attivi fino a 5 giorni dopo l'iniezione, che li rende facilmente accessibile ed utilizzabile in sezionare percorsi che sono coinvolti.



Esempio di uso di morfolino: supponiamo di aver identificato un gene per lo sviluppo del cuore nell'embrione di zebrafisch, quando si è ancora allo stadio di una sola cellula, si inietta morfolino specifico per questo gene.
A questo punto se il gene è importante realmente per lo sviluppo del cuore mi aspetto che il cuore non si formi, o che non si formi normalmente.

3) Silenziamento genico post trascrizionale: silenziamento genico svolto dall'RNA a doppio filamento, l'RNA interference, RNAi.
   L'effetto che produce è quello di degradare un messaggero specifico.
   È un meccanismo conservato attivo in funghi, piante, animali.
   È un sistema di difesa che hanno tutte le cellule dalla penetrazione di acidi nucleici esogeni, ma ha anche un ruolo fisiologico nella biosintesi di molti RNA cellulari e di regolazione dell'espressione genica.
   L'RNA non è solo l'effettore molecolare deputato a trasferire l'informazione genetica dal DNA all'apparato traduzionale, ma ha anche funzioni catalitiche, catalizza la formazione e scissione dei legami fosfo diesterici in assenza di proteine.
   È una scoperta che ha portato a novità come l'utilizzo dell'antisenso.
   Questo fenomeno è stato chiamato co-soppressione, dai biologi vegetali, repressione, dai biologi fungini, e interferenza dell'RNA, dai biologi dello sviluppo animale.
   Spesso è ora chiamato silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS).
   Sembra che l'aggiunta sia il senso, antisenso, o gene a doppio filamento.
   In cellule può causare la distruzione dell'omologia dell'mRNA a quella fatta dal gene introdotto.

RNAi

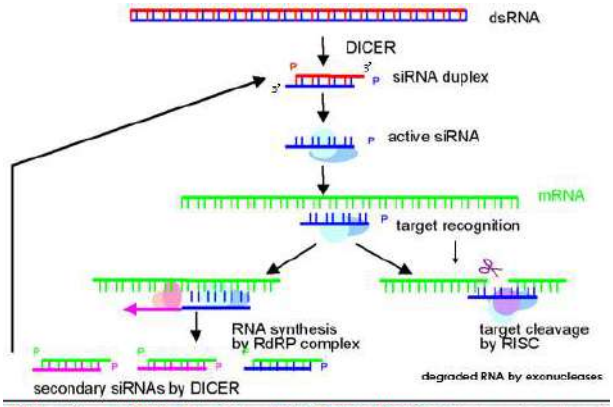
Tra gli anni '80-'90, due scienziati ricercatori stavano lavorando sulla produzione di fiori di petunia con colorazione più vivace.
Per raggiungere questo scopo, introdussero nelle piantine alcune copie aggiuntive di un gene noto per codificare un enzima fondamentale nella colorazione dei petali, ma sorprendentemente, molte piantine così trattate non presentavano gli attesi colori intensi ma erano privi di colore.
Sia il gene endogeno che il transgene erano stati soppressi, ed il fenomeno fu definito come co-soppressione dell'espressione genica, ma il meccanismo molecolare, in ogni caso, rimaneva ignoto.
La rivoluzionaria scoperta della RNAi avvenne per caso in seguito ad esperimenti in corso su organismi vegetali negli USA e nei Paesi Bassi a cavallo tra gli anni ottanta e gli anni novanta.

C'erano due possibili meccanismi: silenziamento genico trascizionale oppure silenziamento genico post-trascrizionale.

Ci fu un altro lavoro con la tecnologia dell'RNA antisenso, si iniettò par-1 dentro le cellule di C. elegans clonarono tale gene, e con ciò videro che tale gene era importante per la divisione dello zigote.
Si chiese quindi di fare ulteriori controlli, e di iniettare l'RNA senso per vedere cosa succedeva, e in teoria non si doveva avere produzione di fenotipo, ma si ottennero produzioni di fenotipi mutanti.
Non era chiaro cosa producesse tale effetto.
Tre anni dopo da ciò uscì un lavoro che chiarì il perché avveniva ciò, ovvero che esiste un interferenza genetica specifica dell'RNA doppio filamento.
Per fare dell'RNA senso o antisenso in vitro ci vgliono polimerasi fagiche.
Studiando queste RNA polimerasi ci si accorse che erano estremamente specifiche, ma in alcuni casi potevano produrre RNA aberranti.
Quello che si ipotizzò è che non sia stato un effetto dell'RNA senso a produrre tali fenotipi, ma che sia stato un RNA a doppio filamento.
Creano quindi tale RNA, lo iniettano in C. elegans, e si accorsero che questo fenotipi si producevano con una frequenza elevata.
Inoltre si accorsero che non importava iniettarlo, ma che bastava mettervi le cellule a contatto, e questo entrava spontaneame.
L'RNA a doppio filamento è quindi l'interferenza genica che distrugge i trascritti, è molto speci, ed è molto potente poiché può essere trasmesso alle generazioni successive.
Questo inoltre si diffonde spontaneamente in tutto l'organismo sia se iniettato che se messo solo a contatto con le cellule.

Tale processo avviene in tre stadi:
L'RNA doppio filamento si costruisce in vitro con un'RNA polimerasi che trascrive in un plasmide sia un RNA senso che antisenso, e questi due vengono fatti legare per poi venire trasmessi o inietatti negli organi in modo che penetri in tutte le cellule.

1) Stadio iniziale: i dsRNA sono processati da un enzima, DICER, una RNAsi III con attività endonucleasica, che taglia il dsRNA in tanti small interfering RNA o siRNA (21-23 nt);
2) Stadio effettore: i siRNA vengono incorporati in un secondo complesso enzimatico endonucleasico, RISC, RNA induced silencing complex, che usa il siRNA per riconoscere, in base all'appaiamento delle basi, il substrato da degradare.

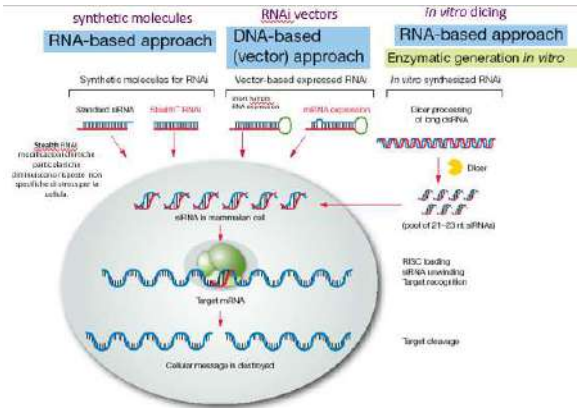


RNA-polimerasi RNA-dipendente: step di amplificazione (nelle regioni adiacenti)

RISC ha un'attività elicasica ATP-dipendente che serve a separare i due frammenti di RNA, mediata da una proteina argonauta con un dominio PAZ che lega il duplex siRNA, e un domino Piwi, che taglia ibridi RNA/siRNA.
Quando è tutto frammentato si ha un effetto di knockdown, non si produce più proteina;
3) Amplificazione: presente solo in alcuni organismi, questi frammentini sono usati come primer per produrre nuovi RNA doppio filamento.
Questo meccanismo è simile a quello dei miRNA, utilizza gli stessi meccanismi enzimatici.
L'appaiamento perfetto non è richiesto nei miRNA, mentre è assolutamente necessario nei siRNA.

Gli RNAi funzionano in tutti gli organismi, ma non funzionano nei mammiferi, ciò perché nei mammiferi esistono dei meccanismi di protezione del genoma più avanzati, tra cui i meccani degli interferoni, che distruggono ogni cosa che penetra nella cellula più grande di 21-22 nucleotidi.
Sono state messe appunto delle varianti che permettono di utilizzare questa tecnica anche nei mammiferi.

Tali varianti sono tre:



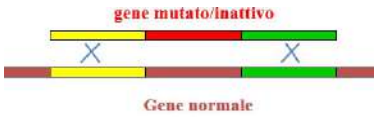
1) si può fare tutto il processo per arrrivare ai siRNA in vitro, l'RNA è sintetizzato in vitro, così si hanno frammenti più piccoli da inserire.
   Ciò ha però un effetto tossico, ma è stata messa appunto una tecnologia per abbassare questa azione tossica.
   Questa prevede di rendere i siRNA "invisibili", vengono modificati chimicame per diminuire la risposta delle cellule.
2) si creano vettori e si fa fare tutto il lavoro alla cellula.
   Nei vettori si inserice una parte di RNA che produce RNA senso, un loop breve di qualche nucleotide, e una che produce RNA antisenso.
   In tal modo quando avviene la trascrizione si avrà RNA in grado di appaiarsi, e si ottiene una struttura che ricorda molto i pre-miRNA.
   Questi brevi frammentini sono stati prodotti dentro la cellula, utlizzando i sistemi enzimatici della cellula stessa.
3) Se si hanno organismi acquatici, si può inserire del liquido e inseri qui i siRNA, così penetreranno nell'epidermide, oppure si possono dare da mangiare ad un organismo che mangia dei batteri.
   Questi due sistemi alternativi all'iniezione permettono di fare grandi numeri di esperiemti.

TRANSGENI TECHNOLOGIES

Knock in = rimpiazzo di un gene con un gene a scelta.
Knock out = si toglie un gene, si inattiva.

La prima storia di un sistema animale modello, un topo, risale al 1982, dove si dimostrò che topi modificati con ormone della crescita erano molto più grandi del normale.
Si mostrò che modificando l'espressione genica si modificano i fenotipi, era infatti stata fatta un'aggiunta di un gene che produce l'ormone della crescita, producendo così una quantità eccessiva dell'ormone.
Questo esperimento ha aperto il periodo degli oncomice, sistema modello che hanno permesso di capire molte cose sulla formazione di tumori, del cancro.
Questi hanno prodotto un patrimonio di nuova conoscenza, diventano temi di proprietà intellettuale, e ha generato un vivace campo della ricerca sul cancro che sta rivelando i meccanismi di tumorigenesi e suggerendo nuove strategie terapeutiche per il trattamento della malattia umana.

Omologia mirata:
Il principio è di sostituire in maniera mirata il gene, si devono quindi avere regioni di omologia a monte e a valle del gene endogeno che si vuole sostituire.



CRISPR **(lezione Chiara Gabellini)**

GENOME EDITING

È un tipo di ingegneria genetica il cui oggetto è il DNA, in cui vengono inserite, cancellate o sostituite delle sequenze nel genoma di un organismo.
Le applicazioni e gli scopi sono di determinare l'alterazione di geni correlati, coinvolti, nell'insorgenza di una malattia con:

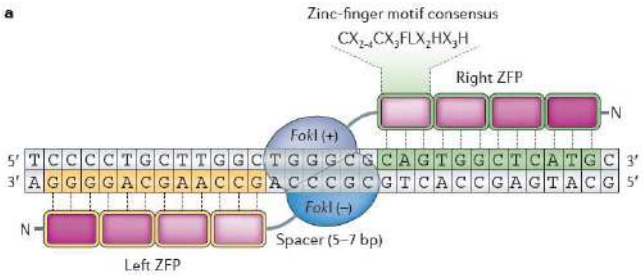
- produzio di modelli applicabili poi all'uomo;
- correzio di geni responsabili di patologie;
- identificare i geni responsabili di una patologia.

Le tecniche di genome editing più vecchie coinvolgono proteine Zinc-fingers modificate e le TALENs.
Più recentemente è stata scoperta la CRISPR/Cas-9, che ha una maggiore efficacia.
Tutte inducono nel DNA dei double strand break, ovvero la creazione di un doppio danno al DNA, su entrambi i filamenti dell'elica.

Questi danni possono esse riparati da due vie:

a. non homolugus and joining;
b. homologus ricombinaton.

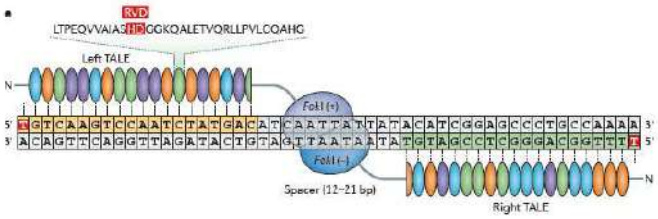
ZINC-FINGER NUCLEASI



Queste partecipano alla trascrizione, sono dei domini responsabili delll'interazione del DNA.
Queste sono state ingegnerizzate per creare proteine con domini Zinc-fingers e, a seconda della sequenza che avranno, potranno interagire con specifiche sequenze presenti sul DNA.
Queste coppie di Zinc-fingers riconoscono le sequenze dei due filamenti di DNA complementari e l'attività nucleasica della fokI induce il double strand break.

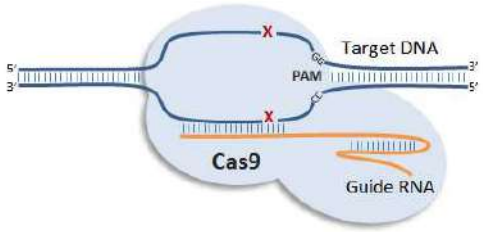
TALENs

La struttura è simile alle Zinc-fingers, si ha sempre una coppia di TALENs, una parte di spacer, e un'altra parte di TALENs che riconoscono il filamento complementale nella sequenza fiancheggiante.



CRISPR/Cas-9

È emersa ed ha soppiantato le altre tecniche, questa tecnica del CRISPR si basa sulla presenza della prote Cas-9, la quale ha attività nucleasica, in grado di attivarsi in presenza di un etero-duplex.
Queste sequenze di RNA guida sono in grado di riconoscere una sequenza complementare sul DNA target, e anche qui si crea così una double nick.

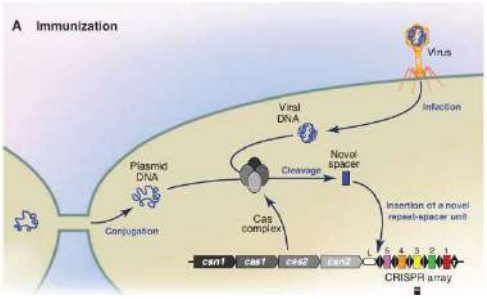


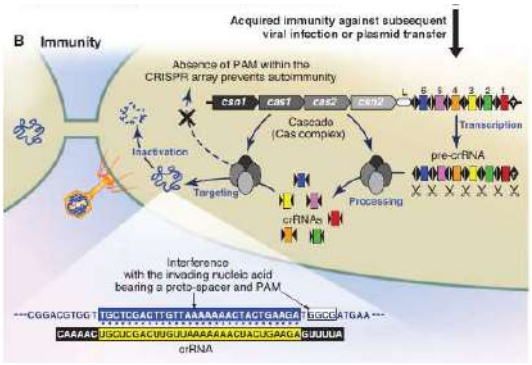
I loci CRISPR sono stati identificcati in più della metà dei procarioti, infatti la loro funzione originaria è quella di difendere il genoma batterico da elementi genetici invasivi, principalmete sequenze geniche virali.
Questo sistema è abbastanza recente, poiché è stato scoperto nel 2007 ed è stato usato a partire dal 2013 nella genome editing.

I loci CRISPR consistono in una serie di ripetizioni non contigue, quindi con degli spacers, associate, adiacenti, a geni per le proteine Cas.
Il primo esperimento che è stato fatto consisteva in infezioni di fagi su diversi ceppi batterici, e si vide che questi presentavano queste ripetizio: S1, S2, S3, etc.
A seconda di quale di queste sequenze avevano, i batteri presentavano diversa resiste a questi fagi.
Le CRISPR sono classificate in tre tipi, che si differenziano nei repertori di geni CRISPR-associato, l'organizzazione di operoni Cas e la struttura delle ripetizioni nelle matrici CRISPR.
Il più semplice tra i sistemi CRISPR-Cas è di tipo II, in cui le attività di endonucleasi necessarie per l'interferenza con il DNA sono concentrate in una singola proteina multidominio, Cas-9, e sono guidati da una molecola di crRNA.
Questo macchinario enzimatico compatto e DNA sito-specifico è facilmente programmabile e mira a rendere i sistemi di tipo II i migliori candidati per una nuova generazione di potenti strumenti per l'ingegneria genomica.

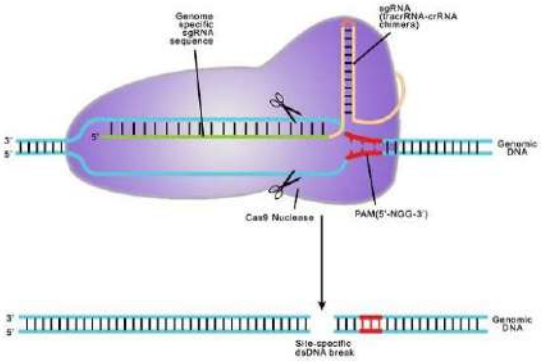
La matrice CRISPR serve come una memoria immunitaria e come meccanismo di difesa.
Nel 2005, furono fatti tre indipendenti studi in silico, riferito all'omologia tra le sequenze di distanziatori e gli elementi extracromosomici, come virus e plasmidi.

Ciò ha portato all'ipotesi che CRISPR può fornire immunità adattativa contro elementi genetici estranei.
Il virus infetta la cellula, rilascia DNA virale, e si crano delle seque di genoma virale che vanno a formare le sequenze CRISPR.
Infatti la prima fase del meccanismo è l'incorporazione di DNA estraneo nel locus CRISPR pur mantenendo le stesse fiancheggianti ripetizioni ripetitivi.
Il passo successivo è la trascrizione e la lavorazione del locus CRISPR in brevi segmenti (60bp) RNA chiamato crRNAs.





La collezione di frammenti crRNAs si legano alle proteine Cas e agiscono come complessi ribonucleoproteici, consentendo l'accoppiamento delle basi del crRNA a qualsiasi DNA bersaglio estraneo che viene successivamente digerito dalla ribonucleasi. L'attività catalitica della proteina Cas, elimina l'infezione secondaria dagli stessi fagi o plasmidi.
Nel momento in cui la cellula viene infettata con il virus, si assiste ad una risposta immunitaria, nel caso dei batteri si assiste ad una attivazione dell'immunità.
Quando il DNA virale viene riconosciuto alla sua seconda infezione, avvengono meccanismi che lo inattivano.
Questo viene riconosciuto grazie al fatto che a valle di queste sequenze virali c'è una seque PAM che vien sfruttata da CRISPR.
La sequenza PAM non è mai presente nella sequenza dei loci CRISPR, ma solo appunto nel genoma virale.
Ciò serve al batterio per preservare un'autoimmunita, per evitare di autodanneggiarsi.



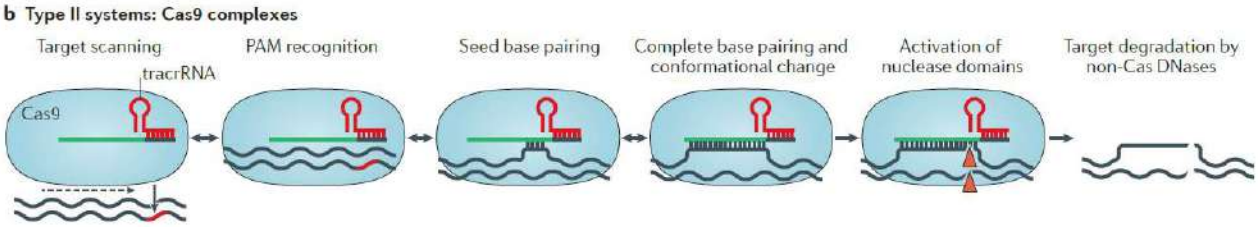
Struttura e attivazione della Cas-9:
Nei batteri c'è una proteina, la Cas-9, e un DNA che è estraneo con una sequenza riconoscibile che è complementare alla sequenza del crRNA.
C'è una sequenza PAM nel DNA estraneo.
La struttu dell'RNA è costituita da: crRNA, che è la parte variabile, e da tracrRNA/Cas-9 che è costante.
Nella pratica di laborato si sintetizza un RNA guida, quindi dal dimero tracrRNA-crRNA si passa ad un'unica molecola di RNA guida, che prende molta ispirazio da questa struttura dimerica, una sequenza di 20 nucleotidi complementari alla sequenza che si vuole targhettare, e una sequenza costante con funzione strutturale.
La sequenza costante riconosce la sequenza sul filamento del DNA target, e la Cas-9 determina il doppio nick sia sul filamento complementare all'RNA guida, sia sull'altro filamento complementare.
La Cas-9 ha una sequenza di domini con attività nucleasica, quindi di taglio al DNA.
Una parte della proteina Cas deve alloggiare la sequenza duplex di DNA-RNA, e quella che è la sequenza PAM che è a livello del dominio C-terminale.
Se l'RNA guida non è legato al DNA, la proteina ha una struttura che la auto-inattiva, si attiva solo con tale legame.

Come Cas-9 interroga il DNA per trovare i siti di taglio specifici:
Si forma il complesso Cas-9/RNA guida, che è ancora inattivo.
Si ha una sorta di scansione del DNA fino a che la sequenza C-terminale Cas-9 riconosce la sequenza PAM.
Inizia così ad esserci un'appaiamento di circa 20 nucleotidi, e a questo punto avviene il taglio.
Le caratteristiche che le sequenze guida devono avere per essere riconosciute sono disegnate da strumenti informatici.
Quindi:

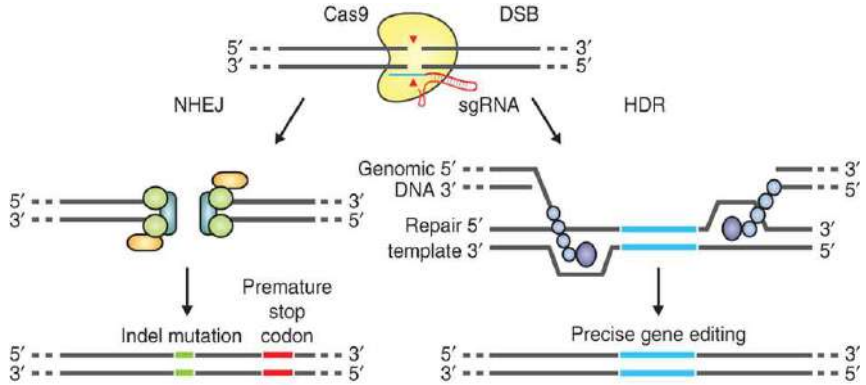
1. la rilegatura e la scissione del DNA da parte Cas9-RNA richiedere la rilevazione di un motivo trinucleotide protospacer (PAM) adiacente breve;
2. la separazione dei filamenti di DNA e la formazione di heteroduplex RNA-DNA si avviano dalla sequenza PAM e procedono verso l'estremità distale della sequenza bersaglio;

3. le interazioni PAM/Cas-9 innescano l'attività catalitica.

Un elemento critico del sistema Cas-9 è il motivo protospacer adiacente (PAM), che fiancheggia l'estremità del sito bersaglio del DNA e determina appunto il DNA bersaglio del meccanismo di ricerca di Cas-9.
Il riconoscimento PAM è coinvolto nello scatenare la transizione tra obiettivo vincolante Cas-9 e conformazioni di scissione.
La separazione avviene attraverso meccanismi sconosciuti.
Saggi su DNA competitore di scissione hanno suggerito che la formazione dell'heteroduplex RNA-DNA viene avviata dal sito PAM.



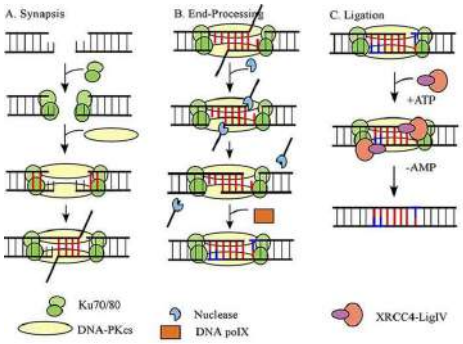
GENOME EDITING IN EUCARIOTI



Come già accennato questi danni possono esse riparati da due vie:

a. non homolugus and joining;
b. homologus ricombinaton.

a. Non homologous end joining repair (NHEJ):



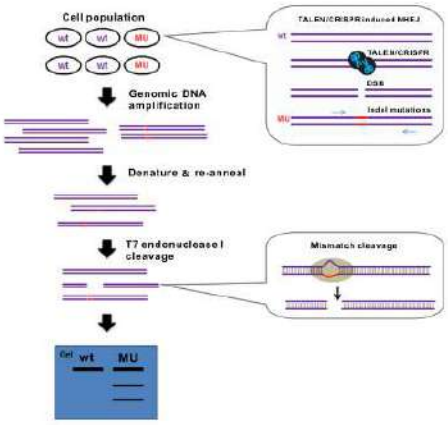
Sono soggette ad errori.
La conseguenza di queste è che può avvenire una riparazione precisa, che ripristina così la sequenza wild type.
Oppure se si è fortunati si insinuano mutazioni, come inserzioni, frame shift, etc.
In questo caso non si è in grado di prevedere il tipo di mutazione che verrà indotta, poiché questi errori di riparazione sono totalmente casuali, quindi si potrebbero avere anche delle mutazioni che non sono d'interesse, o che sono troppo gravi.

Il primo esempio di applicazione di CRISPR si ebbe in Zebrafish, il cui uno dei vantaggi è che la fecondazione è esterna, quindi è molto facile raccogliere le uova allo stato di zigote.
A questo stato si può iniettare un RNA guida e l'RNA per la Cas-9, sfruttando quella che è la trascrizione dello zigote.
La Cas-9 viene tradotta in proteina e si può osservare una modificazione del genoma di zebrafish.
Si è targhettato un gene di cui la mancanza risulta visibile fenotipicame, in questo caso fu la tirosinasi, che è presente in molti degli step della sintesi della melanina.
Nelle larve iniettate con questa Cas-9 e RNA guida contro tirosinasi, si notava uno sbiancamento, il che indicava che tale modificazione era avvenuta.

In ratto Sono stati progettati sei sgRNAs destinati a sei diversi siti genomici codificanti ratto Tet1 (sgTet1-1 e sgTet2-1), Tet2 (sgTet2-1 e sgTet2-2) e Tet3 (sgTet3-1 e sgTet3-2), rispettivamente.

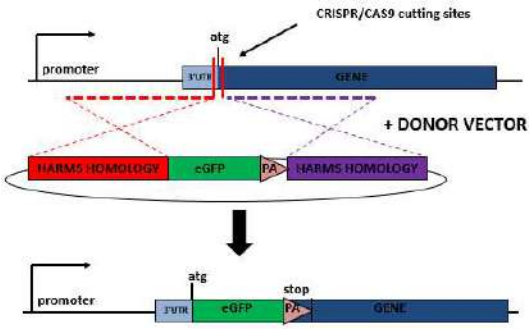
È stata analizzata l'efficienza della mutazione tripla del gene dei sistemi CRISPR-Cas tramite co-iniezione di sgRNAs per i tre geni tet insieme Cas9 mRNA in embrioni di ratto allo stadio unicellulare.
Un totale di 22 cuccioli appena nati sono stati ottenuti dai 70 embrioni iniettati, ed esaminandoli tutti si è trovato che 13 ratti contenevano mutazioni dei tre geni Tet.

Come riconoscere le mutazioni:
Dal momento in cui si applica la tecnica del CRISPR/Cas-9, si amplifica la zona target, e si avranno varie sequenze wild type, ma anche varie sequenze mutate.
Nel momento dell'annealing si può formare un doppio filamento avente un filamento con seqenza wild type e uno con sequenza mutata, e si sfrutta la presenza di questo mismatch grazie ad una T7 endonucleasi, la quale li riconosce e taglia.
Facendo una corsa elettroforetica si avrà un'unica banda per i wilde type, poiché sono tutti uguali, mentre si avranno più sequenze per i mutanti, poiché hanno sequenze più corte e di varia misura.
Quindi per vedere se è avvenuta una mutagenesi, amplifico, sottopo a T7, e si fa una corsa elettroforetica.
Lo step successi è di mandare il tutto al sequenziamento per vedere in che modo queste sequenze sono cambiate.
Si utilizzano dei pool di RNA guida per sequenze che non si conoscono.



Esistono dei protocolli sperimentali per cui si possono usare due RNA guida contemporaneamente, e sono molto importanti nel momento in cui si lavora con un gene con tanti esoni, come ad esempio nel caso della distrofina nella distrofia di Duchenne.
In questo modello di topo con mutazione nell'esone 51, il modello CRISPR/Cas-9 con doppio RNA guida è in grado di modificare queste sequenze con l'esclusione dell'esone avente mutazione, o comunque producendo una sequenze in frame, si fa una sorta di splicing alternativo.

b. Homologus ricombinaton:
Si ha un esempio di correzione di una malattia genetica in topi grazie all'uso di CRISPR/Cas-9.
Si dimostra che i topi con una mutazione dominante in un gene che causa la cataratta potrebbero essere salvati da co-iniezione in zigoti di Cas-9 mRNA e di un RNA a singolo guida (sgRNA) rivolte alla allele mutante.
La correzione avviene tramite un'omologia-riparazione diretta (HDR), basata su un'oligonucleotide esogenamente fornito o endogeno allele wilde type.
Questi topi portano una delezione di 1 bp nell'esone 3 del gene specifico, questa mutazione porta ad un codone di stop al 76° aminoacido e quindi la produzione di un troncato GC-cristallina, con conseguente cataratta nucleare sia in topi mutanti omozigoti e eterozigoti allo svezzamento.



ANIMALI MODLLO NELLA RICERCA BIOMEDICA **(lezione Cecilia Pucci)**

Un modello è quella condizione che permette di studiare i processi biologici e comportamentali di base, o in cui può essere studiato un processo patologico indotto, e nel quale il fenomeno è simile, almeno sotto un certo punto di vista, allo stesso fenomeno nell'uomo o in altre specie animali.

La maggior parte dei modelli animali di laboratorio sono sviluppati e utilizzati per studiare la causa, la natura e la cura di malattie umane.
L'importanza dei risultati derivati dalla sperimentazione, e la possibilità di estendere l'estrapolazione dei risultati dipende dal tipo di modello e dalla natura della ricerca.
Un animale modello è una semplificazione del modello umano, è una specie estensivamente studiata per comprendere particolari fenomeni biologici, in base al presupposto che le acquisizioni fatte sull'organismo modello possano fornire indicazioni sugli altri organismi.

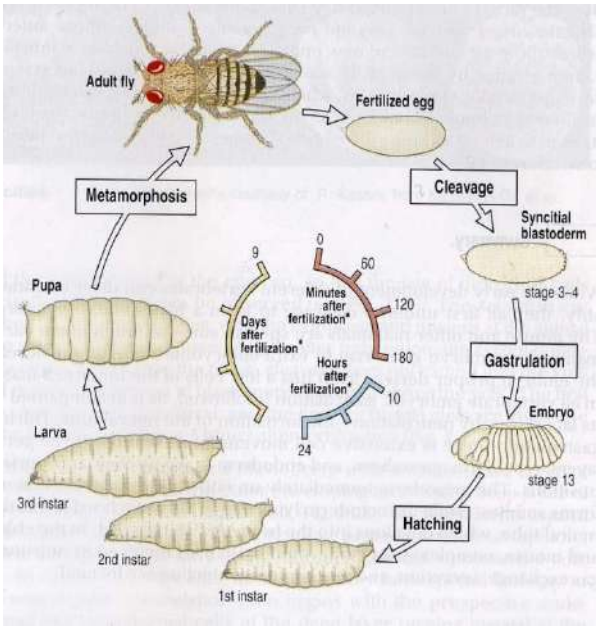
Ciò è possibile grazie al fatto che i principi biologici fondamentali, come le vie metaboliche, di regolazione e di sviluppo, e i geni che le codificano, si mantengono attraverso l'evoluzione.

In sintesi un organismo modello serve per far crescere la comprensione scientifica, per lo studio delle malattie, e per poter sviluppare e sperimentare potenziali forme di trattamento.

Scelta dell'animale:
Spesso vengono scelti in base alla loro capacità di essere adattabili a manipolazioni sperimentali, e di solito vengono preferite le seguenti caratteristiche:

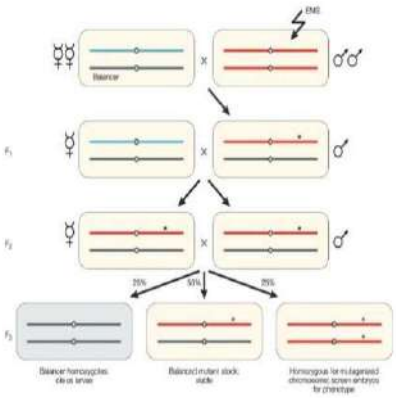
- deve essere economico;
- facile da allevare o coltivare;
- di dimensioni contenute;
- deve avere un ciclo vitale ragionevolmente breve;
- non deve presentare particolari problemi di sicurezza.

DROSOPHILA



Venne conside come la regina della genetica classica.
Il genoma è composto da 3 autosomi ed 1 coppia sessuale costituita da cromosomi X e Y. (2n=8)
Le dimensioni del genonoma sono di 180 Mb, e venne completamente sequenziato.
Il numero di geni è di 13'000, e la dimensione media per gene è di 3kb, ci sono circa 4 esoni per gene.
Questo genoma presenta circa il 50% di omologia con il genoma umano.

L'uovo fecondato dopo 48 ore da origine all'animale adulto, un animale molto piccolo e con ciclo vita breve.
Nella linea germinale del maschio non avviene ricombinazione meiotica, cioè non può contrinuire con i propri gameti a dare progenie ricombinante, quidni determina la possibilità di mantenere i rapporti di associazione cromosomica degi alleli ereditati attraverso il genitore maschile uitle per la pianificazione degli incroci
I cromosomi di questo animale sono politenici, molto grossi, ed hanno permesso il bandeggio dei loci genici e quindi di trovare dove si posizionavano le mutazioni indotte.
Molte mutazion sono visibili, ad esempio come l'occhio wild type, oppure barr ice (occhi piu piccole), oppure mutazioni rigurdanti le ali o la colorazio del corpo, le quali sono tutte recessive.
Oppure mutazioni dominanti come la forma delle antenne, la forma delle setole.
Il successo di Drosophila melanogaster come organismo modello è in gran parte dovuto al potere di forward screens genetici, per identificare i geni che sono coinvolti in un processo biologico.



Schema di screening:
Si parte da maschio mutato, ad esempio trattato con EMS che aggiunge un gruppo alchilico (etilico) alla guanina in modo che possa appaiarsi con la timina, e lo si incrocia con femmina con cromosoma bilanciatore.
I cromosomi bilanciatri hanno mutazioni che in omozigosi portano alla morte della larva o alla sterilità, sono mutazioni recessive.
Tutta la progenie maschile viene incrociata con un'altra femmina uguale alla madre.
A questo punto i figli si incrociano tra loro.
Si otterrà così:

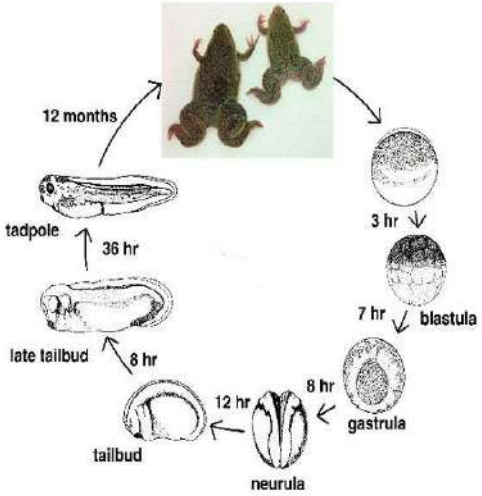
- 25% della progenie morirà;

- 50% della progenie avrà mutazione recessiva non visibile e lo stesso aspetto del padre, sono gli eterozigoti;
- 25% della progenie sarà omozigote con la mutazione visibile.

Se si prende una Drosophila occhi bianchi, W-, e si usa un transgene con occhi rossi, W+, se questo viene iniettatto allo stato sincizio, si ha lo sviluppo e si ottiene progenie con occhi bianchi, poiché il transgene si è integrato solo nelle linee germinali.
Se si fa incrociare questo con un individuo con W-, si otterrà progenie W+.
Inoltre se il gene dell'occhio si integra casualmente, si possono avere degli occhi ectopici che si formano al posto di altri organi.

La Dorsophila non può essere genotipizzata, quindi servono queste mutazioni visibili.
Non è possibile fare il knock out per non far funzionare il gene.

XENOPUS LAEVIS

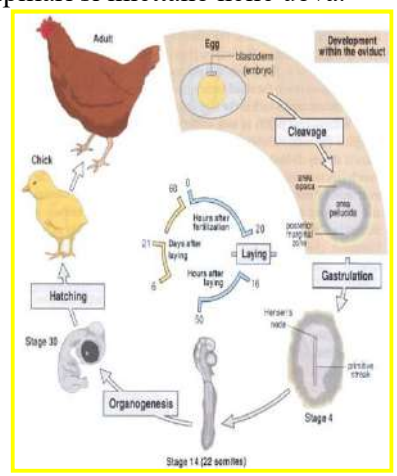


Il vantaggio maggiore nell'utilizzare questo animale è quello di poter ottenere facilmente, durante tutto l'anno, uova attraverso la stimolazione della femmina con gonadrotopina corionica umana (HCG), per poi fecondarle con spermatozoi in vitro, ottenendo un gran numero di embrioni che si svilupperanno in sincronia.
Gli embrioni sono di grandi dimensioni, comprese tra 1-1,2 mm di diametro, e, inoltre, il loro sviluppo è esterno, il che li rende facilmente manipolabili dallo sperimentatore.
Crescono molto bene in una soluzione salina fisiologica e mostrano uno sviluppo precoce estremamente rapido: dal momento della fecondazione, solo dopo circa 13,5 ore ha inizio la neurulazione.
L'organogenesi è invece completa dopo solo 2 giorni.
Si ha una divisione oloblastica.
Il ciclo per arrivare allo stadio di adulto è però molto lungo, la maturità sessuale viene raggiunta dopo 3 anni.

Si può avere un guadagno di funzione, ovvero si ha un aumento di quello che è il gene endogeno, tramite iniezio di trascritto stabile, oppure si può avere una perdita di funzione, tramite l'uso del morfolino che porta alla degradazione dell'RNA a cui si associa.

C'è la possibilità di fare iniezioni solo ad un blastomero, in modo che l'altra metà funzioni da controllo.
La microiniezione però può essere effuata solo in stati precoci, quando si è nello stadio da 1 a 16 cellule.
In stati più tardivi si può usare il desametasone, che si lega a recettori chimerici, trasloca nel nucleo e si ha così la produzioze della proteina chimerica.

La transgenesi non è possibile a causa del ciclo vitale lungo per ragiungere la maturità sessuale e perché questo animale ha un genoma tetraploide.
Si può però utilizzare lo Xenopus Tropicale, che è più piccolo e produce meno uova.
Si mettono gli spermi in soluzione ipotonica in modo che vengano espulsi i nuclei, si mettono poi questi in soluzione con enzimi ed il DNA che si vuole integrare, si prendono e con capillari si iniettano nelle uova.
Il DNA che si inietta, che ha una mutazio del gene di interesse, si associa ad esempio il gene della GFP, in modo che negli embrioni che lo hanno integrato, tale gene sia visibile ai raggi UV.



GALLUS GALLUS

Dopo 20 ore dalla ferilizzazione si ha la deposizione dell'uovo, se questo viene però posto a 14 gradi si può interrompe il suo sviluppo.
Gli embrioni di pollo vengono usati per lo studio dell'angiogenesi della biologia vascolare.

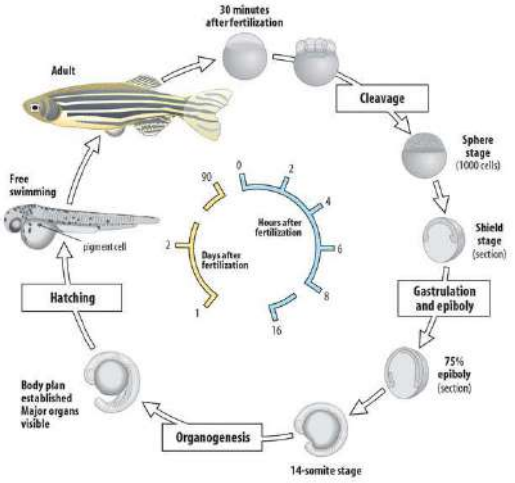
È possibile visualizza lo sviluppo dell'embrione sia nel guscio, in ovo, che al di fuori, ex-ovo.
Questi embrioni sono trasparenti, quindi è possibile avere un contrasto iniettando dell'inchiostro atossico.
È molto usato anche nello studio dello sviluppo del cancro, per vedere come questo crea i vasi per potersi nutrire.
Il pollo è usato spesso come banco di prova per una futura transgenesi in topo, poiché molti enanchers tra questi due animali sono conservati.

Si può iniettare del DNA d'interesse nel tubo neurale insieme ad un marcher.
Ai lati dell'embrione vengono poi posizionate due placche di platino, un anodo ed un catodo, inducendo un elettroporazione a voltaggio più basso ma più diratura, in tal modo si ha un controllo interno dello spostamento del DNA.
Ad esempio, se si posiziona il catodo a destra, il transgene verrà integrato a sinistra ed il DNA verrà spostato a destra, perché essendo negativo verrà attratto dal catodo.

Trapianto quaglia-pollo:
Questi due hanno uno sviluppo abbastanza sincrono, molto simile, ed è possibile distinguere le cellule perché le cellule di quaglia sono più dense.
Si possono trapiantare arti da uno di questi animali all'altro, e si possono fare sia trapianti isotopici, si trapianta nello stesso posto, sia esotopici, si trapianta n zione diversa dalla prelevazione per vedere quanto è forte l'influenza in una diversa località.
Inoltre possono esserci trapianti isocronici, tra animali allo stesso stadio, o esocronici, sempre per poter vedere l'effetto che ha ciò.

ZEBRAFISH

È un pesce di acqua dolce che è in grado di tollerare un ampio range di temperatura, pH e salinità.
Danno la disponibilità di 100/200 uova per incrocio, trasparenti e con sviluppo esterno.
Ore dopo la fecondazione, circa 24, si ha subito la circolazione e un cuore che batte, costituito solo da un ventricolo ed un atrio.
Il genma di questo animale è stato completamente sequenziato, e si è trovata un omologia di circa il 70% con il genoma uomano.

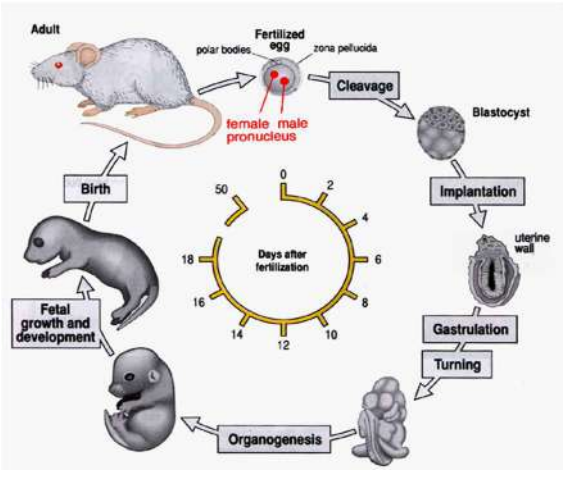


Sono stati creati moltissimi mutanti, ad esempio il Casper che mantiene la trasparenza dei tessuti anche nello stadio più avanzato, è una muta recessiva.
Questo è usato soprattutto per studiare la metastatizzazione.

Transgenesi:
È altamente utilizzata, ma non è detto che il transgene si integri subito quando si è nello stadio a singola cellula, si può avere una chimera, poiché si potrebbe integrare allo stadio a due cellule ad esempio.

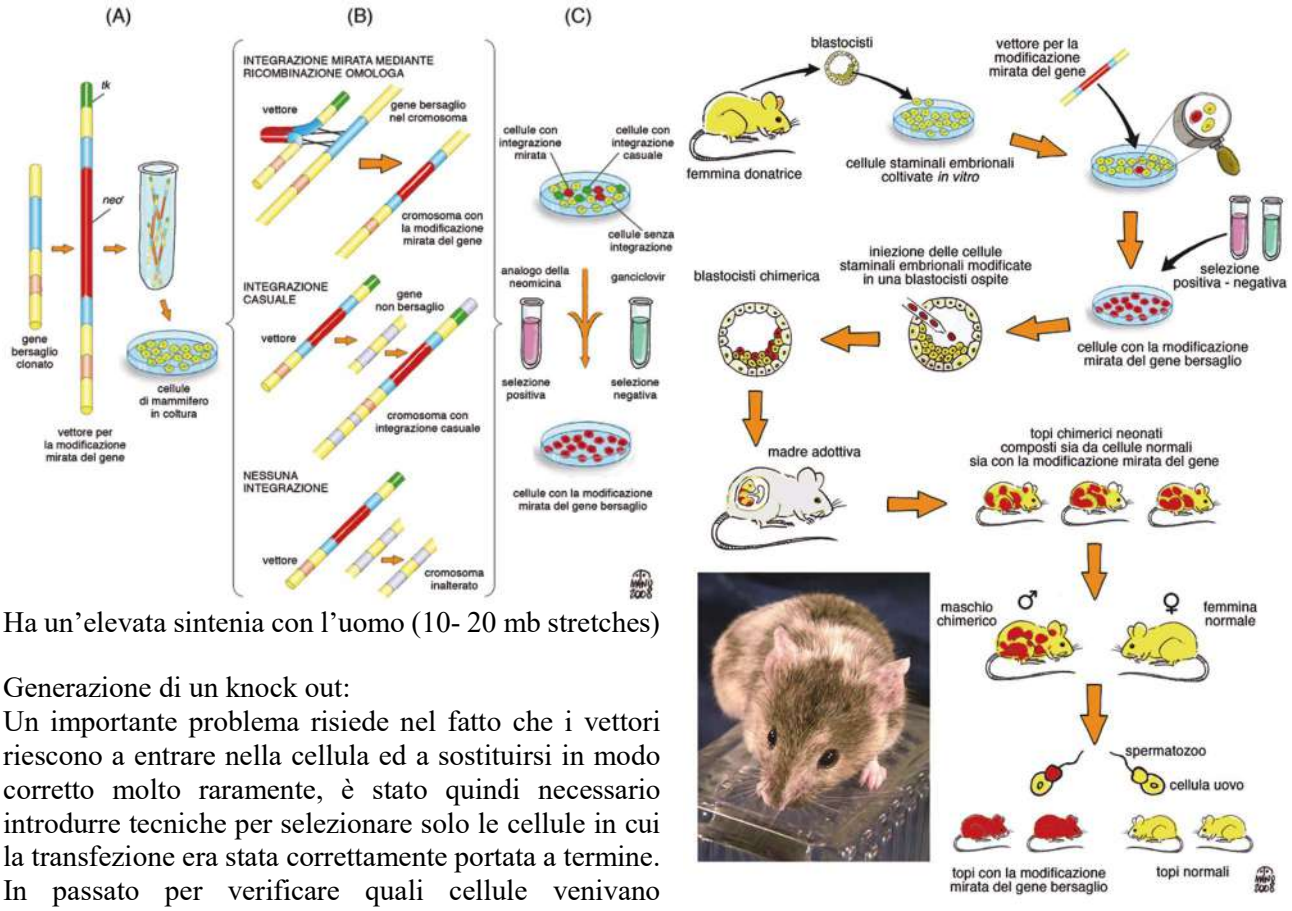
Può esse usato per un live imaging.

È utilizzato in tantissimi ambiti, è stato possibile grazie a questo studiare modelli di malattie umane come: la distrofia muscolare, la sindrome di Hult-Oram, l'autismo oppure il melanoma.



TOPO

È il più usato per similitudine all'uomo.
È un mammifero evolutivamente vicino all'uomo, ha una lunga vita riproduttiva.
Le placenta e lo sviluppo precoce sono simili all'uomo.



Ha un'elevata sintenia con l'uomo (10- 20 mb stretches)

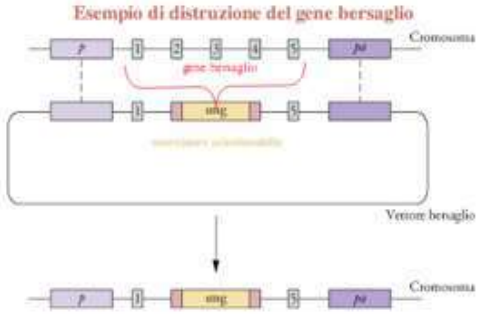
Generazione di un knock out:
Un importante problema risiede nel fatto che i vettori riescono a entrare nella cellula ed a sostituirsi in modo corretto molto raramente, è stato quindi necessario introdurre tecniche per selezionare solo le cellule in cui la transfezione era stata correttamente portata a termine.
In passato per verificare quali cellule venivano effettivamente transfettate era indispensabile la PCR, oggi si usano vettori a selezione positiva/negativa che utilizzano particolari marker di selezione.
Due sono i marker utilizzati:

- il primo è di solito un gene che conferisce resistenza ad un antibiotico: il gene viene inserito in posizione molto ravvicinata a quello da inattivare o addirittura al suo interno, in questo modo, aggiungendo l'antibiotico in coltura sopravviveranno solo le cellule in cui il vettore con il gene, tra cui quello per la resistenza all'antibiotico, si è inserito stabilmente nel genoma.
  Può succedere però che il vettore si inserisca per ricombinazione non omologa in un punto qualsiasi del genoma, in tal caso non abbiamo l'inattivazione del gene che volevamo, ma l'inserimento casuale in un qualunque altro punto del genoma, per evitare questo si usa un secondo marker.
- questo seconondo marker di solito è una sequenza codificante per la timidina chinasi (TK): la sequenza è posta in posizione distaccata rispetto al gene da sostituire, la timidina chinasi è un enzima in grado di attivare la forma tossica del ganciclovir, di conseguenza visto che la sequenza per la TK difficilmente viene inserita per ricombinazione omologa, aggiungendo il ganciclovir, solo le cellule transfettate e che avranno subito la ricombinazione omologa sopravviveranno.
  Una PCR di verifica è comunque consigliabile al fine di evitare falsi positivi.

Nel caso si utilizzi solo la PCR per il controllo si farà una prima verifica delle cellule ricombinate ed una seconda per selezionare quelle in cui la ricombinazione è stata omologa su uno dei due alleli.

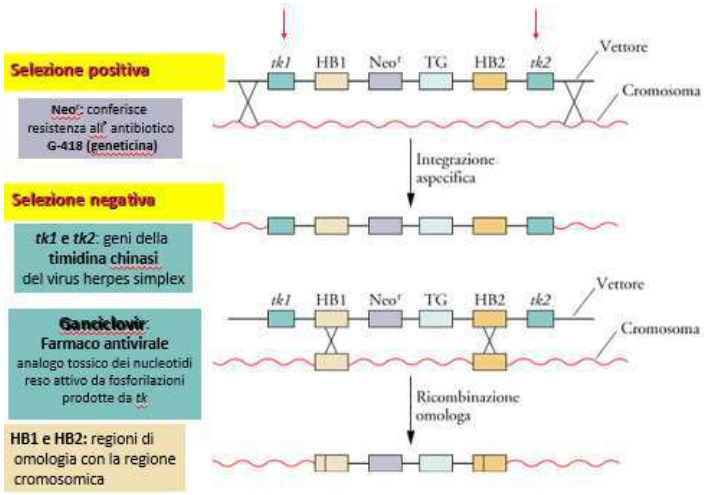
GENE TARGETING: RICOMBINAZIONE OMOLOGA MIRATA

Gli interventi di genome editing sono interventi a livello genico, modificando/togliendo un gene si ha ripercussione sull'espressione del messaggero.
È un intervento più drastico in confronto agli interventi che si possono fare sui trascritti.
Il gene targeting si basa sull'appaiamento di due sequenze omologhe, seguito da scambio di materiale genico.



È favorito dalla presenza a monte ed a valle di sequenze identiche, e si favorisce grazie anche ad un crossing over.
In caso di knock out si mette a monte ed a valle una regione di omologia, e questo gene verrà sostituito se avviene il crossing over da un qualcosa che impedisce la sua espressione.
Per controllare tale evento ci sono dei sistemi per identificarlo, uno di questi è il gene neoR, codificante la neomicina fosfotransferasi, non presente negli eucarioti.
Si mette del G418 nel terreno, geneticina, tossica per le cellule poiché blocca la traduzione inibendo lo step di allungamento in cellule sia procariotiche che eucariotiche, ma se queste contengono neoR si ha l'inattivazione dell'azione tossica, poiché fosforilano G418.

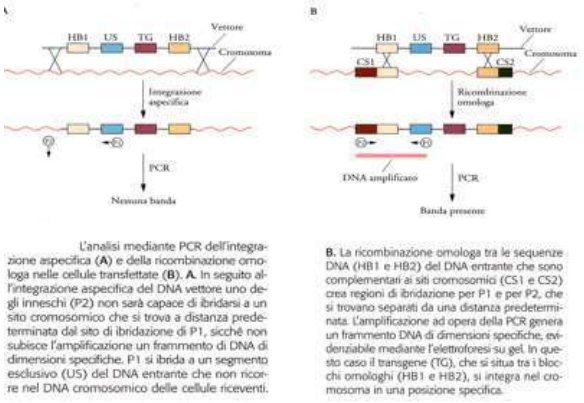
Selezione positiva-negativa mediante G-418 + ganciclovir:



Ganciclovir/aciclovir sono farmaci antivirali, analoghi tossici dei nucleotidi.
L'incorporazione della forma attiva (trifosfata) nel DNA Porta a terminazione della sintesi.
Questi composti vengono convertiti in forma attiva da una serie di fosforilazioni, la prima delle quali può essere effettuata dalla timidina chinasi virale, ma non dagli enzimi cellulari.

Abbiamo nel vettore quello che sarà il plasmide da sostituire, si mettono le regioni di omologia che servono per il crossing over, si mette il gene neoR, e poi il transgene d'interesse da inserire.
Se si integra in modo aspecifio noi abbiamo che questi geni della timidina chinasi possono rimanere nel genoma, ma se avvie correttame il crossing over questi due geni non vengono integrati nel genoma e verranno quindi persi, e nel genoma non ci saranno questo geni per la timidina chinasi.
Per selezio la presenza o meno di questi bisogna quindi usare un farmaco antivirale.
Quando si ricombina in maniera specifca, nel punto del crossing over si hanno il neoR e il transgene, a questo punto si può fare selezione positiva con G418, e chi ha neoR sopravvive.
Ma c'è anche la possibilità che questo si integri in maniera anomala, si ha lo scambio, però uno dei due geni timidina chinasi può rimane nel genoma, questi ricombinanti vanno eliminati, quindi si fa selezio negativa con ganciclovir, attivo solo se avviene la fosforila della timidina china, in tal modo queste cellule vengono distrutte.

Ulterio controlli si possono fare mediante PCR, e si è visto che si possono avere delle integrazioni aspecifice (A), oppure delle integrazioni specifiche (B).
In quelle specifiche si hanno le due regioni di omologia, il transgene, il marcatore selezionato.
Si può cotrollare se è avvenuto tutto correttamente prendendo a monte un primer foward nella regione prossima dove si suppone che sia avvenuto il crossing over, fuori dalla regione modificata, e prendendo poi un primer revers dentro tale regione.
Questa amplificazione deve avere le dimensioni attese.
Se fosse avvenu un'integra aspecifica può succedere che il primer foward non viene trovato, e non si trova così un prodtto di amplificazione.



L'analisi mediante PCR dell'integrazione aspecifica (**A**) e della ricombinazione omologa nelle cellule transfettate (**B**). **A.** In seguito all'integrazione aspecifica del DNA vettore uno degli inneschi (P2) non sarà capace di ibridarsi a un sito cromosomico che si trova a distanza predeterminata dal sito di ibridazione di P1, sicché non subisce l'amplificazione un frammento di DNA di dimensioni specifiche. P1 si ibrida a un segmento esclusivo (US) del DNA entrante che non ricorre nel DNA cromosomico delle cellule riceventi.

B. La ricombinazione omologa tra le sequenze DNA (HB1 e HB2) del DNA entrante che sono complementari ai siti cromosomici (CS1 e CS2) crea regioni di ibridazione per P1 e per P2, che si trovano separati da una distanza predeterminata. L'amplificazione ad opera della PCR genera un frammento DNA di dimensioni specifiche, evidenziabile mediante l'elettroforesi su gel. In questo caso il transgene (TG), che si situa tra i blocchi omologhi (HB1 e HB2), si integra nel cromosoma in una posizione specifica.

Questa selezione mediante PCR ci da quindi un'ulteriore conferma di avere una ricombinazione omologa.

TRASFEZIONE

Si tratta di trasferire acidi nucleici dentro delle cellule eucariotiche.
Si possono modificare le cellule in coltura, le cellule staminali, e questo ci permette di modificare geneticamente anche gli organi modello.
Quando si modifica geneticamente qualcosa si può fare una:

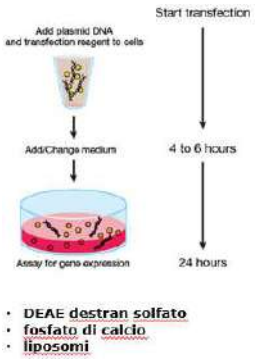
- trasfezione transiente: il gene non si integra nel genoma ma resta in forma episomica, e resta in forma di anello per un po' di tempo e poi viene distrutto.
  Si usa in esperimenti a breve termine, non dà la possibilità di contare quanti plasmidi e vettori vengono inseriti;
- trasfezione stabile: il gene si integra nel genoma, dove rimarrà per sempre.
  Tale trasfezione si usa quando si vogliono fare degli esperimenti a lungo termine.

Questa trasfezione avviene con vari sistemi:

1) chimici;
2) fisici;
3) biologici, sono quelli che funzionano meglio.

1) METODI CHIMICI

Si usano ancora ma poco, il DEAE ha soltanto valore storico, mentre i liposomi si usano ancora moltissimo.

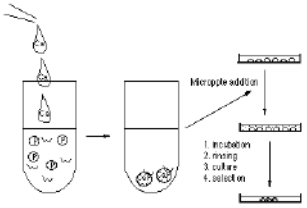


Si mette in soluzione il DNA plasmidico con reagente di trasfezione, che può essere sia il DEAE che il fosfato di calcio.

➢ Il DEAE entra per endocitosi nelle cellule che lo incorporano e permette così l'espressione del transgene che viene trasportato, si tratta di trasfezione transiente, con efficienza molto bassa.

Il DEAE-destrano è il primo metodo usato per l'introduzione di DNA nelle cellule eucariotiche, il destrano è un polisaccaride costituito da unità di D-glucosio legate insieme, è un carboidrato policationico, idrosolubile.

Quando viene associato a gruppi carichi positivamente DEAE (dietil-ammino-etile), che è positivo, è in grado di legare il DNA, negativo, e di mediarne l'ingresso attraverso le membrane.

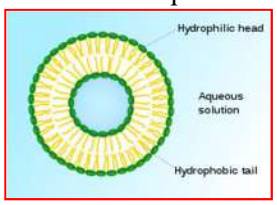


➢ Il fosfa di calcio con DNA forma precipitati che entrano nelle cellule, avviene un incubazio, e poi si selezionano per vedere se vengono incorpora.

È un meccanismo economico ed è relativamente versatile.

È tecnicamente semplice, ad efficienza bassa, con elevata citotossicità e non funziona con alcuni tipi cellulari.

➢ Il sistema più efficiente è quello della lipofezione.



La membrana è formata da una doppia catena fosfolipidica, ed è stata ricreata facendo dei liposomi.

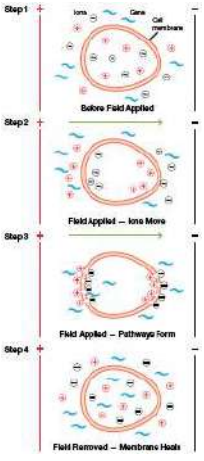
Esistono diverse formulazioni di liposomi, alcuni di questi sono neutri, altri positivi all'esterno e fissano facilmente le molecole di DNA.

I complessi lipidi-DNA si fondono con le membrane cellulari e rilasciano spontaneamente il loro contenuto nelle cellule.

Hanno bassa tossicità, ma anche basso rendimento.

2) METODI FISICI

Ne esistono di vari tipi, come l'elettroporazione, che provoca aperture dentro le cellule mediante corrente elettrica, la gene gun, che spara il DNA nelle cellule con una pistola, oppure la microiniezione.



➢ L'elettroporazione consiste in una repentina scarica elettrica operata in un piccolissimo contenitore che racchiude cellule e molecole di DNA in una sospensione liquida.

La scarica apre simultaneamente la membrana plasmatica delle cellule in numerosi punti, permettendo alle molecole di DNA di penetrare, è possibile ottimizzare i parametri di elettroporazione per i diversi tipi di linee cellulari, variando l'intensità del campo elettrico e la durata del trattamento.

Le cellule sono messe in cuvette contenente elettrodi, ed il campo elettrico produce aperture nella membrana cellulare.

La cosa più difficile è trovare le condizioni di corrente che permette fori adatti alla penetrazione del DNA, ma non devono essere pori troppo larghi, si ha un alta mortalità cellulare.

A fine di ciò la membrana viene riparata.

Per essere espresso però il DNA deve riuscire a penetrare nel nucleo.

- La gene gun usa una pressione regolabile ad elio per sparare microcarriers d'oro rivestiti di DNA sulla parete interna di una cartuccia di plastica direttamente sul bersaglio.

Sparano ad altissima velocità nei tessuti, e queste particelle sono in grado di attraversare la membrana plasmatica e quella nucleare rilasciando il DNA nel nucleo delle cellule del tessuto bersaglio.
Questo "proiettile" viene sparato fino ad un certo punto, dopo di che il macroproiettile si ferma e dei microproettili vengono spinti a gran velocità nelle cellule nella capsula petri.
È soprattutto usato nelle piante

- Nella microiniezione il dna viene inserito nella cellula, nel citoplasma o nel nucleo, attraverso un capillare di vetro, con un sistema a pressione.

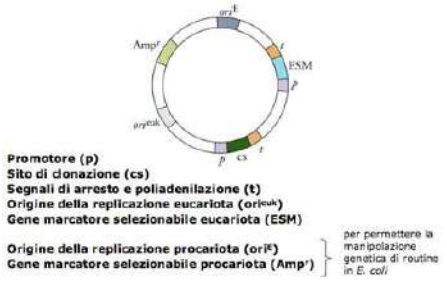
Per motivi pratici è più frequentemente usato in clinica, in tecniche come la fecondazione artificiale, che non in laboratorio dove si lavora con un alto numero di cellule.
Date le ridotte dimensioni delle cellule la microiniezione richiede una sofisticata apparecchiatura che comprende:

- un microscopio;
- un micromanipolatore;
- un iniettore.

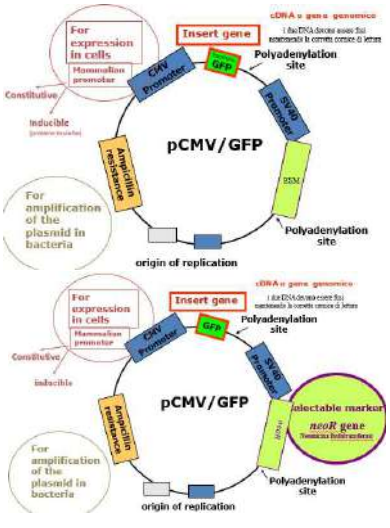
Le tecniche di microiniezione delle cellule sono generalmente di due tipi, a seconda se le cellule bersaglio aderiscono al fondo di un piatto di coltura o se le cellule sono non aderenti e galleggiano liberamente nel mezzo.
Con le cellule aderenti, l'obiettivo è di solito iniettare il DNA o la proteina nel nucleo, o nel citoplasma, mentre la cellula si espande sul fondo del piatto, la procedura di iniezione è noiosa per un gran numero di cellule e spesso danneggia e uccide le cellule, a seconda dell'abilità dell'operatore.
Un fattore che contribuisce alla morte cellulare è che la maggior parte degli strumenti di microinezione non hanno un controllo molto preciso sul movimento degli aghi e la membrana cellulare è strappata durante dall'iniezione.
La microinezione con le cellule non aderenti implica una pipetta di supporto che applica una soave aspirazione alla cella tenendola in posizione, in modo che l'ago di iniezione non sposti la cellula.
Questa situazione è tipica nei laboratori di clonazione veterinaria dove il materiale viene iniettato in oociti o embrioni non aderenti durante le procedure di clonazione, si verifica anche in alcuni tipi di fertilizzazione umana in vitro in cui uno spermatozoo viene direttamente iniettato nell'oocita.

VETTORI DI ESPRESSIONE PER CELLULE DI MAMMIFERO

I vettori eucarioti hanno le stesse caratteristiche dei vettori procarioti.



La fase di amplificazio per avere un numero maggiore possibile di vettori si può fare nei prcarioti.
Questi devono avere caratteristiche come un sito di origine dell'ampificazione oppure il gene di resistenza ad ampicillina.
Ci dovrà poi essere un sito di origine della replicazione eucariota, un sito con un marcatore selezionabile diverso da quello procariota, deve portare il transgene in un sito multiplo di clonaggio.
Deve avere quindi caratteristiche sia per i procarioti che per gli eucarioti.
Questi si chiamano vettori shuttle o vettori navetta.



Quando si sceglie un vettore di espressione in cellule di mammifero, è importante conoscere bene prima quali sono gli elementi funzionali che sono in genere contenuti in un vettore.
In genere i promotori sono da virus che infettano cellule di mammifero o da geni di mammifero, come la metallotioneina, comunque sia dei promotori forti.
Anche i segnali di poliadenilazione devono essere efficienti.
La presenza di una ORI euk fa replicare il vettore come episoma, ma il vettore può anche integrarsi stabilmente, è inoltre necessario poter riconoscere le cellule che hanno acquisito il DNA esogeno.

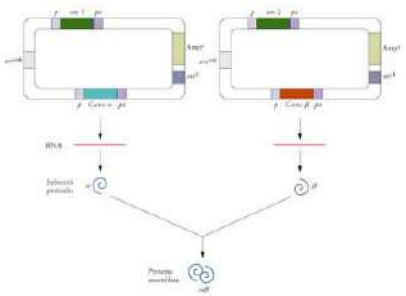
I marker di selezione permettono di produrre delle linee cellulari che esprimono stabilmente il gene di interesse. Gli agenti di selezione possono essere scelti in funzione delle caratteristiche considerate più importanti dall'utilizzatore: selezione veloce, oppure economica di linee cellulari stabili, oppure ancora selezione di due o più vettori (selezione doppia).
Per selezionare le cellule in cui è avvenuta l'acquisizione, basta metterle in ampicillina.
Per vede come si può selezionare le cellule che hanno questo vettore si inserisce un marcatore di selezione, neoR, e si mette sotto il controllo di un promotore forte per esse sicuri che si esprima bene, ad esempio SV40.
Il promotore che condiziona l'espressio del gene deve essere in base alle esigenze dell'operatore, può esse forte, cioè sarà espresso fortemente sempre, oppure può essere un promotore inducibile, lo esprime solo quando si ha una sostanza che rende il promotore attivo.
In alcuni vettori si ha GFP che puo dire visivamente se tale gene verrà espresso, in tal caso il gene verrà messo in frame con la GFP.

Ci sono siti di clonagio multipli fatti da una serie di enzimi di restrizione, e si seleziona quello che permette di inserire il segmento che si vuole.
Spesso i frammenti che si vogliono clonare sono prodotti da amplificazione, in questo caso vendono plasmidi già aperti che precludono una T a 5' e 3' delle due eliche, questo perché quando si hanno prodotti di amplificazione si forma in genere una A in più alle estremità, permettendo così il legame diretto.

Overespressione:
Un'overespressione della proteina clonata può interferire con la crescita delle cellule, soprattutto se si tratta di prodotti tossici.
Il problema superabile usando un promotore inducibile, in tal modo il processo produttivo viene diviso in una prima fase di crescita della biomassa, seguita da una fase di espressione, limitata nel tempo, indotta dal passaggio da una condizione di repressione ad una di induzione.

La forma attiva di molte proteine di interesse commerciale richiede non solo di essere prodotta in cellule eucariotiche per ottenere le corrette modificazioni post traduzionali, ma spesso la forma attiva è costituita da due o più subunità.
L'espressione di due geni su una stessa cellula è necessaria quando la forma attiva di una proteina è costituita da due proteine diverse, eterodimero, come ad esempio nel caso dell'ormone stimolatore della tiroide, costituito da subunità αβ, oppure dell'emoglobina, costituita da subunità α2β2.
In questi casi è preferibile all'assemblaggio in vitro, e si ha la necessità di esprimere le subunità contemporaneamente e stechiometricamente, si inseriscono quindi nella stessa cellula un plasmide per ogni catena.
Ci sono però dei problemi quando si inseriscono due vettori in una stessa cellula, poiché non si ha mai la sicurezza che questi vengano integrati tutti e due con efficienza.

Sistema di cotrasfezione con due vettori di espressione:

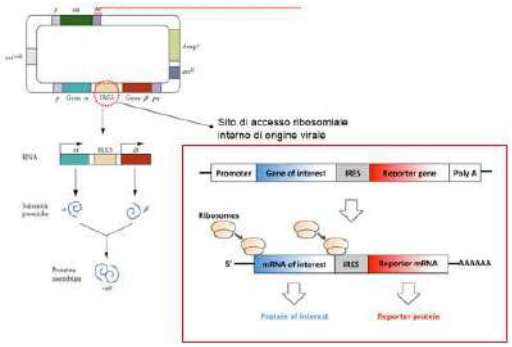


Per scegliere il vettore più adatto, oltre a prendere i considerazione gli elementi funzionali per l'espressione nelle cellule di mammifero, è importante pensare anche a quali saranno le applicazioni successive.
Se è necessario che la proteina venga secreta il vettore prescelto dovrà contenere un segnale di secrezione.
Qualora si debba esprimere più di una proteina alla volta, si possono usare due vettori, ognuno dei quali con un diverso marker di resistenza, oppure un singolo vettore con due promotori e due siti MCS.
La forma attiva di molte proteine commerciali richiede non solo di essere prodotta in cellule eucariotiche per ottenere le corrette modificazioni post traduzionali, ma spesso le proteine attive sono costituite da due o più subunità.
Si può fare cotrasfezione con due vettori diversi, ma uno di questi può essere perso o "lavorare"con efficienza diversa, ed il prodotto ottenuto può non essere ottimale come resa.
Quindi si possono avere problemi come:

- perdita di uno dei plasmidi;
- differenze nel numero di copie dei plasmidi;
- differenze nella forza dei promotori.

VETTORE A DOPPIA CASSETTA E VETTORE DICISTRONICO

Per sopperire a tale problemi è stato ideato un vettore che prese il nome di vettore a doppia cassetta.
La doppia cassetta sta nel fatto che il vettore contiene due regioni, una per inserire il gene A ed una per inserire il gene B, sotto il controllo di uno stesso promotore, in tal modo si evita la perdita di uno dei plasmidi.
Questo non garantisce però che la produzione avvenga son la stessa efficienza pur avendo lo stesso promotore.
Al posto del vettore a doppia cassetta si può usare un miglioramento, il vettore dicistronico.
Questo tipo di vettore ha comunque il gene A ed il gene B sotto il controllo di un unico promotore, ma tra i due geni si ha sequenza IRES, di origine virale, che è un sito di accesso ribosomiale.
Si esprime così il messaggero del gene A e del gene B.
Questo si può usare per misurare quanta proteina viene prodotta se al posto del gene B viene messo un gene reporter, ed il livello di espressione della proteina fluorescente riflette il livello di espressione del gene.
Poichè sono espresse come due proteine separate c'è un rischio ridotto di interferire con l'attività biologica della proteina.



VETTORI NON VIRALI

I vantaggi di questa tipologia sono che questi possono trasferire molti tipi diversi di molecole, e permettono di trasdurre molecole di DNA anche molto grandi, inoltre si ha una possibilità di produzione in grandi quantità a basso costo.
Gli svantaggi sono invece che hanno una scarsa efficienza di trasfezione e di integrazione, effetti non duraturi, e che se integrati possono a loro volta dare mutagenesi inserzionale.
La maggior parte degli enzimi utilizzati nella tecnologia del DNA ricombinante sono ora commercializzati nei sistemi di espressione di E. coli.
Possono essere prodotte anche grandi quantità di molte proteine di interesse eucariotico, ma tuttavia alcune proteine eucariotiche non possono essere prodotte in forma attiva nelle cellule E. coli, queste includono proteine che sono ampiamente modificate durante o dopo la loro sintesi, come le glicoproteine a cui vengono aggiunti i gruppi di carboidrati.
E. coli manca degli enzimi che catalizzano molte delle modificazioni post-traduzionali riscontrate sulle proteine eucariotiche.
Per superare questa limitazione dei sistemi di espressione di E. coli, i ricercatori hanno sviluppato vettori di espressione eucariotica che consentono l'aggiunta di opportune modifiche post-traslanti alle proteine espresse.
Tali vettori possono essere usati in vari tipi di cellule eucariotiche per dirigere abbondante sintesi di proteine eucariotiche da geni clonati.

VETTORI VIRALI

Sono dei virus manipolati geneticamente in modo da risultare non pericolosi per l'organismo, ma ancora in grado di infettare le cellule dell'ospite.
Tra i vantaggi hanno un'alta efficienza di trasduzione, ma tra gli svantaggi c'è la possibilità di generare nuovi virus patogeni per ricombinazione con eventuali virus presenti nell'ospite, la possibilità di una mutagenesi inserzionale, il poter trasportare molecole di dna di dimensioni limitate.
Ad esempio gli herpes simplex virus sono dei vettori che hanno un tropismo specifico per il sistema nervoso centrale e possono instaurare nei neuroni infezioni latenti che durano a lungo, non sono però in grado di integrarsi e quindi l'espressione è transiente.
Sono usati in terapie geniche per Alzheimer e Huntington.
I vettori derivati invece da adenovirus possono infettare moltissimi tipi cellulari, hanno un ingresso molto efficiente per endocitosi mediata da recettori, ma il DNA non si integra.
Sono usati per la terapia genica, ma inducono forti risposte immunitarie.
I vaccini virus sono usati per esprimere geni estranei per produrre vaccini ricombinanti, questi vettori esprimenti proteine immunogene crescono in coltura, gli animali da esperimento infettati con questi vaccini sono protetti contro l'agente infettivo.
Sono benigni, a meno che gli individui siano immunodepressi (AIDS), quindi va bene come vettore.

Replicazione del virus:

Prevede:
- il disassemblaggio delle particelle infettive virali;
- la replicazione del genoma virale;
- la sintesi delle proteine virali grazie al macchinario di traduzione dell'ospite;
- il riassemblaggio delle nuove particelle virali.

Il genoma è impacchettato in un rivestimento proteico, detto capside, che in alcuni virus è ulteriormente racchiuso da un involucro lipidico contenente proteine virali di superficie e transmembrana, detto envelope.

A causa della natura di parassita intracellulare obbligatorio, il virus può esprimere la sua attività biologica solo all'interno di una cellula ospite che permetta la completa espressione del suo genoma e la produzione di nuove particelle virali.
Il virus si lega sulla superficie della cellula ospite e vi introduce il proprio genoma, quest'ultimo deve essere in grado di esprimersi e di utilizzare l'apparato sintetico della cellula per la sintesi dei costituenti virali.
Questi costituenti si combineranno in modo da formare i nuovi virioni, i quali, una volta liberati dalla cellula, estenderanno l'infezione ad altre cellule dell'ospite.
La replicazione virale può avvenire solo in cellule sensibili, capaci di fare esprimere completamente il genoma virale.
La cellula ospite deve avere due caratteristiche principali:

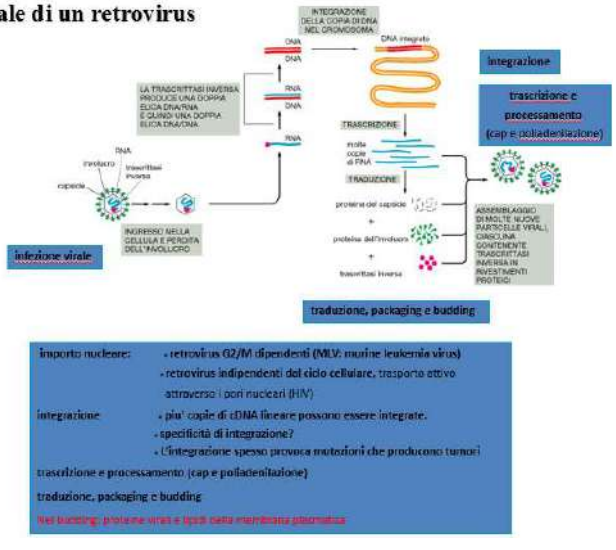
1) sensibilità: strettamente condizionata dalla presenza di adeguati recettori cellulari che permettono l'attacco del virus alla cellula ospite, adsorbimento;
2) permissività: dipende da tutti quei meccanismi molecolari-cellulari che risultano adeguati alla completa trascrizione del genoma virale e alla sintesi di tutte le proteinevirus-codificate.

- Infezione produttiva: infezione di una cellula permissiva da parte di un virione completo che porta alla produzione di virionidi progenie in numero variabile a seconda del tipo di virus o di cellula.
- infezione abortiva: in alcuni casi l'infezione può non completarsi, ciò si verifica quando il virus infettante è difettivo (mancano ad es. parti essenziali del proprio genoma) o quando la cellula consente l'espressione di solo alcuni geni virali portando all'arresto dell'infezione.
- infezione restrittiva: quando le cellule sono permissive solo in una certa fase del loro ciclo vitale.

Adsorbimento: richiede un'interazione tra specifiche strutture di superficie del virione, antirecettori, con recettori della membrana citoplasmatica della cellula.
La specificità del legame determina il tropismo virale, cioè la proprietà dei virus di infettare prevalentemente determinate specie animali.
Molti degli antirecettori sono le glicoproteine nei virus con envelope e proteine semplici nei virus nudi, i recettori sono strutture che nella cellula svolgono normalmente una funzione fisiologica ben precisa.
L'adsorbimento richiede solo una partecipazione passiva della cellula.

Retrovirus:
Hanno una dimensione di 7-12kb, eseguono una trascrizione inversa e l'integrazione.
È il solo tipo virale che, per replicarsi, dipende dalla sua integrazione nel genoma della cellula ospite.
I retrovirus sono una classe di virus avviluppati contenenti una molecola RNA a singolo filamento come il genoma.
A seguito dell'infezione, il genoma virale viene convertito in DNA a doppio filamento, che si integra nel genoma ospite e viene espresso come proteine.
Il genoma virale è di circa 10 kb, contenente almeno tre geni: gag, codifica per le proteine del nucleo, pol, codifica per la reversibilità

Ciclo vitale di un retrovirus



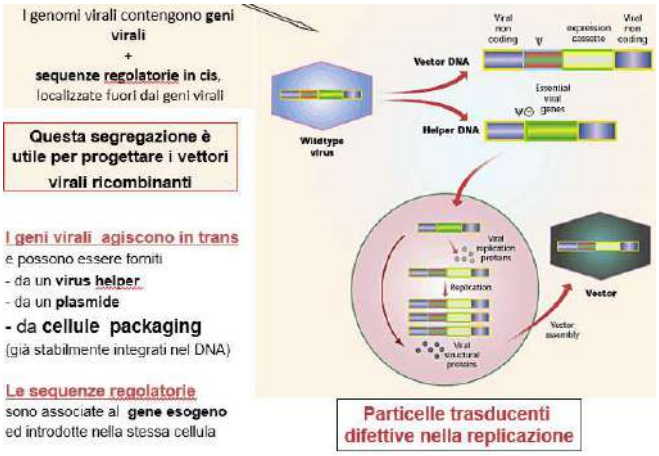
importo nucleare:	- retrovirus G2/M dipendenti (MLV: murine leukemia virus) - retrovirus indipendenti del ciclo cellulare, trasporto attivo attraverso i pori nucleari (HIV)
integrazione	- piu' copie di cDNA lineare possono essere integrate. - specificità di integrazione? - L'integrazione spesso provoca mutazioni che producono tumori
trascrizione e processamento (cap e poliadenilazione)	
traduzione, packaging e budding	
Nel budding, proteine virali e lipidi della membrana plasmatica	

della transcriptasi, ed env, codifica per la proteina busta virale.
Ad ogni estremità del genoma sono lunghe ripetizioni terminali, LTR, che includono regioni di promotore/enhancer e sequenze coinvolte nell'integrazione.
Sono necessarie sequenze per l'imballaggio del DNA virale, psi, e dei siti di splint RNA nel gene env.

Lentivirus (HIV):
Oltre a questi geni, l'HIV contiene altri sette geni accessori che hanno funzioni regolatorie del ciclo virale e della sintesi proteica: Tat, Rev, Nef, Vpu, Tev, Vif, Vpr.

Vpr nel genoma di HIV-2 non esiste e ve n'è un altro chiamato Vpx.
Agli estremi si trovano due sequenze, dette long terminal repeats, LTR, contenenti elementi regolatori dell'espressione genica.
In esse infatti si rinvengono regioni di legame per fattori sia di origine virale sia cellulare, i quali possono così aumentare o inibire il livello di trascrizione del genoma.
Nei LTR si ritrovano siti di poliadenilazione, per il legame di fattori di trascrizione come SP1 e NF-kβ, la sequenza regolatrice TATA, la sequenza di transattivazione, dove si va a legare la proteina Tat, e anche zone con elementi regolatori inibenti (RN, regolazione negativa).

Strategia generale per la costruzione di un vettore virale:
La cosa piu importante è il fatto che le sequenze regolatorie sono in cis, e localizzate fuori dai geni virali.
Si tolgono i geni virali per sostituirli con la cassetta d'espressione di interesse, e si recuperano i geni virali mettendoli sotto psi mutate, per essere sicuri che non formino il capside.
I virus helper non si usano più poiché vegono vendute delle cellule packaging.
Si inserisce il vettore dentro le cellule packaging, che producono le proteine virali, le proteine incapsuleranno l'RNA prodotto dalla cassetta e poi fuoriusciranno per gemmazione con formazione dell'envelope.



Si ha così la struttura di un virus, ma non le caratterisctiche, e grazie all'envelope si potranno riconoscere i recettori specifici.

VETTORI VIRALI

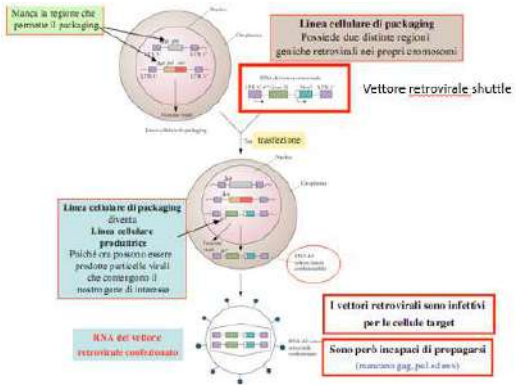
È il metodo più efficiente per inserire dei geni estranei in un genoma.
I vettori virali hanno un efficienza maggire di quelli non virali, inoltre alcuni di questi sono in grado di integrarsi al genoma dando così delle mutazioni stabili e non transienti.
I più usati sono i retrovirus, che comprendono i lentivirus, gli adenovirus, ed i virus adeno-associati.
I retrovirus danno una trasfezione stabile, poiché si inseriscono nel genoma, mentre gli adenovirus danno una trasfezione transiente.

VETTORI RETROVIRALI

La caratteristica principale dei virus da cui derivano questi vettori è che possiedono una funzione di trascrittasi inversa.
Quando un retrovirus si inserisce in un genoma, infatti, si ha una retrotrascrizione, dall'RNA che possiede come genoma si forma cDNA, questo entra nel nucleo e si inserisce nel genoma cellulare.
Quando si ha questo inserimento nel genoma cellulare, il genoma virale subisce una trasformazione, diventa un pro-virus.
Un pro-virus ha un LTR a monte e a valle del genoma, tra queste due sequenze sono situati i geni virali.
Queste LTR si formano nel momento in cui il cDNA si inserisce nel genoma cellulare, e contengono gli elementi regolatori neccessari per far esprimere le proteine virali.

Nei virus più semplici tali proteine sono gag, pol ed env, le quali si inseriscono nella membrana plasmatica, diventando così proteine di membrana.
Queste sono il collegamento che permette al virus di riconoscere le cellule ospiti, le cellule che infetta.

Come diventano vettori:
Tali virus diventano vettori quando si vanno a togliere i geni virali per far posto alla cassetta di espressione.
Quando si tolgono le proteine virali, resta la sequenza psi-virale, la seque di incapsidamento.
I geni delle proteine virali che servono nel vettore vengono inseriti in cellule di packaging, e per sicurezza vengono inseriti in posizioni diverse del genoma.



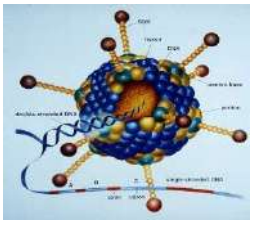
Una volta inserito dentro le cellule di packaging, il vettore retrovirale grazie alla presenza delle LTR, ha gia tutte le sequenze che regolano l'espressione del gene che si vuole inserire.
Questo verrà però inserito in modo random nel genoma cellulare, casuale.
È possibile inserire anche un marcatore insieme al gene.
In queste cellule di packaging, per evitare la formazione di nuove particelle virali quando viene introdotto il vettore, si inibisce l'impacchettamento, si muta la sequenza psi per evitare ciò.
Quello che esce da queste cellule infettate con il vettore virale è un "virus" che contiene il gene che si vuole inserire nelle cellule ospiti, ma che non è più in grado ne di propagarsi ne di dare malattia.
Questi vettori escono dalla cellula per gemmazione, e sono infettive per una serie di cellule target, grazie all'envelope e alle glicoproteine presenti su questo.
Le cellule ospiti che vengono infettate con questi vettori retrovirali saranno quindi modificate geneticamente in maniera stabile, poiché i vettori si comportano come il virus parentale da cui derivano, e quindi si inseriranno nel genoma in copie multiple e casualmente.
Questo tipo di vettori possono però infettare solo cellule che sono in una stato di divisione attiva.

Vettori lentivirali:
Sono un po' più complessi dei vettori retrovirali in senso stretto, poiché i lentivirus hanno un genoma più complesso, oltre ai tre geni fondamentali, questi hanno anche dei geni accessori.
Grazie a questi si possono infettare anche cellule che non sono in divisione, poiché tali geni accessori permettono al genoma virale di attraversare i pori nucleari.
Tali vettori possono quindi essere usati ad esempio in terapie geniche nei neuroni, che sono cellule che non si dividono.
Questa è la differenza fondamentale, un tipo può infettare solo cellule in divisione, l'altro anche le quiescenti.
Entrambi i tipi di vettori permettono di creare genomi stabilmente mutati, e quindi permettono ad esempio di creare animali trans-genici.

VETTORI ADENOVIRALI

Si esprimono transientemente, poiché non si integrano nel genoma cellulare, e derivano da adenovirus o virus adeno-associati.
Il limite dei vettori retrovirali sta nel fatto che, anche se si tolgono geni virali, lo spazio a disposizione per la cassetta d'espressione resta comunque poco, quindi quest'ultima non potrà avere dimensioni molto grandi, massimo 8-10 kb.
Nei vettori adenovirali si ha molto piu spazio.

Gli adenovirus hanno un genoma a DNA abbastanza grande, di 36 kb, sono virus nudi, senza envelope e con struttura del capside icosaedrica regolare.



Dopo l'infezione il virus entra nella cellula ospite ed il DNA viene replicato nel nucleo, senza però integrrsi nel genoma dell'ospite, resta episomale.
I geni degli adenovirus si possono suddivide in due categorie: geni early e geni late.
L'infezione si divide infatti in due fasi:

- Nella prima, o fase early, vengono espressi selettivamente i geni precoci.

Gli eventi early modulano il metabolismo cellulare per favorire la produzione di nuovo DNA virale e l'espressione dei geni late;

- Nella seconda fase, dopo la trascrizione e la traduzione dei geni late, si ha l'assemblaggio di proteine strutturali e dalla maturazione di nuovi virioni.

Esempi di geni early e late sono i geni:

- E1A: coinvolto nell'attivazione della trascrizione e nella promozione dell'entrata della cellula ospite in fase S, lega Rb inducendo il rilascio del fattore di trascrizione E2F;
- E1B: blocca azione di p53, evitando entrata della cellula in apoptosi;
- E2: codifica per 3 proteine coinvolte nella replicazione del DNA e nella modulazione della trascrizione;
- E3: modula la risposta immunitaria;
- E4: regola la trascrizione, la transizione dell'espressione da early a late gene, la replicazione virale e l'assemblamento dei virioni;
- L1-5: coinvolti nella produzione e nell'assemblaggio delle proteine del capside (processamento post-trascrizionale)

Un adenovirus ha delle sequenze di ripetizio dirette piccole a monte e a valle del genoma, e come tutti i virus ha anche una sequenza di incapsidamento che permette di ricostruire il virus.
Queste piccole sequenze di ripetizione ai lati del genoma sono le cosiddette sequenze terminali invertite, ITR, le quali sono necessarie per la replicazione del virus.

La cosa più importante è che quando si sono iniziati ad usare questi vettori si ragionava come per i vettori retrovirali, iniziando quindi a togliere i geni ritenuti non essenziali, ad esempio E1A, E1B.
Si sono creati così i vettori adenovirali di prima generazione.
Successivamente si sono iniziati a togliere anche altri geni, fino ad arrivare ai vettori adenovirali di ultima generazione, in cui sono praticamente stati eliminati tutti i geni, o quasi tutti, che costituivano il genoma virale, lasciando soltanto le sequenza ITR e la sequenza psi.
La sequenze codificate del gene da trasferire, in quest'ultimi vettori, può avere dimensioni notevoli, fino a 100 kb.

Sfortunatamente questi vettori possiedono delle caratteristiche intrinseche che li rendono relativamente tossici e immunogenici, e anche se le numerose modifiche apportate negli anni a questi vettori hanno minimizzato le loro proprietà tossiche, non è stato possibile eliminarle completamente e tuttora ad essi è associata una risposta tossica transiente dose dipendente.

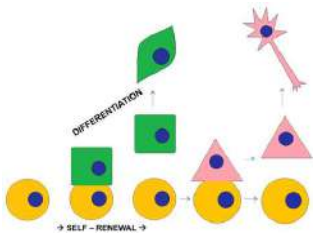
CELLULE STAMINALI

Le cellule staminali possono essere:

- Cellule staminali embrionali;
- Cellule staminali somatiche o adulte;
- Cellule staminali indotte (IPSC).

Queste cellule sono le più importanti per produrre animali trans-genici, o per modificare le caratteristiche di linee cellulari.

Una cellula staminale è una cellula completamente indifferenziata capace di autorinnovarsi mediante divisione simmetrica, e di andare incontro a differenziamento con una divisione asimmetrica, producendo quella che sarà la prima cellula che va incontro a un differenziamento, ancora capace di dividersi asimmetricamente, ma che non è più staminle.



Divisione simmetrica: le due cellule che si ottengono sono esattamente identiche;

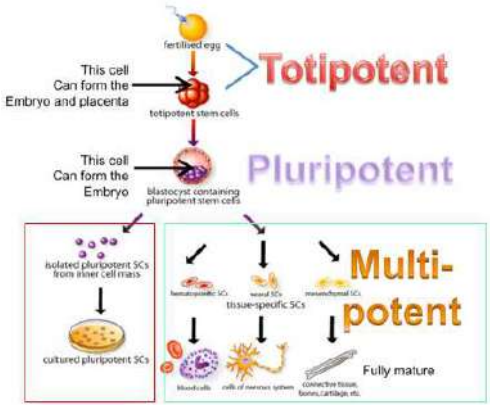
Divisione asimmetrica: le due cellule che si formano non sono completame identiche, ma una è identica alla cellula madre, mentre l'altra avrà caratteristiche leggermente diverse, che non la rendono più staminale.

Piu va avanti il differenziamento di tali cellule, minore sarà la capacità proliferativa, le cellule che si formano tra le cellule staminali e le cellule completamente differenziate sono dette cellule proliferatici in transito.

Una cellula staminale si comporta in questo modo in base alle segnalazioni che riceve dal suo ambiente, detto nicchia.

Altro conce importante quando si parla di cellule staminali è la definizione di:

- totipotenza: le cellule staminali sono in grado di differenziarsi in qualsiasi altro tipo di cellula.
  Si applica fino al momento della compattazione della morula, il momento in cui si forma il trofoblasto, fino a tale momento le cellule sono tutte uguali e hanno potenzialità totale;
- pluripotenza: le cellule staminali sono in grado di differenziarsi in qualsiasi altro tipo di vellula, tranne che in cellule del trofoblasto.
  Dopo che si è formato il trofoblasto, le cellule situate dentro questo saranno in grado di dare origine a tutti gli altri tipi di cellule.
  Tale proprietà è mantenuta fino alla gastrulazione.
- multipotenza: dopo la gastrulazione, le cellule staminali saranno in grado di differenziarsi solo nei tipi cellulare appartenenti al tessuto in cui sono situate.



CELLULE STAMINALI EMBRIONALI

Sono le cellule staminali con potenzialità maggiore, si possono recuperare dalla blastocisti, durante lo sviluppo embriona precoce, prelevandole dalla massa interna di questa.
Vanno però prelevate prima che questa si inserisca dentro l'utero.
Le cellule staminali embrionali sono appunto capaci di dare un embrione, queste hanno lo scopo di aumenta di numero, di crescere, e di essere delle dimensioni adeguate per permettere l'inizio della gastrulazione.
Quando si cerca di mettere in coltura tali cellule, equivale a voler bloccare un processo che spontaneame è transiente, infatti la prima sfida è stata quella di individuare dei sistemi che conse di prende queste cellule e mantenerle con queste caratteristiche di staminalità.

Se si riesce a mantenere in coltura un situazio di pluripotenza di queste cellule, si possono far andare incontro al differenziamento che si vuole, si può così disporre di cellule di ricambio.
Il prendere la blastocisti prima che entri nell'utere per prelevare le cellule staminali e mantenerle in coltura, in un topo si può fare senza problemi, ma nell'uomo no per problemi etici.
Ad esempio, in persone che hanno difficoltà ad intraprendere una gravidanza si può fare la fecondazione in vitro, che mima quello che avverrebbe nelle tube e si crea così la blastocisti in provetta, la quale poi verrà inserita nell'utero.
Per fare tale fecondazione bisogna ottenere prima tanti ovociti, quindi le donne devono essere stimolate fortemente con terapie ormonali, tutti gli ovuli fecondati in eccsso non impiantati restano congelati vivi, a meno che la donna non voglia un'altra gravidanza.
Inizialmente si penso di prendere tali ovuli, portarli a blastocisti ed usarli per gli studi su cellule umane.
Queste, che venivano donate e messe in coltura, funzionavano molto bene e mantenevano la pluripotenza, ma poi iniziarono a sorgere i problemi di natura etica, ovvero, tali blastocisti erano vita umana oppure no? Questo è un problema che ha condizionato molto la ricerca e le collaborazione tra paesi diversi, poiché in ogni paese, al riguardo, si hanno legislazioni diverse.
Tale dilemma la scienza l'ha superato con la creazione di cellule staminali indotte.

CELLULE STAMINALI SOMATICHE

Fino alla massa cellulare interna si hanno cellule staminali embrionali, dal momento in cui la blastocisti si impianta nell'utero, queste cellule perdono la pluripotenza e diventano multipotenti.
Dopo la gastrulazione, queste cellule diventano le cellule staminali dei singoli tessuti, sono presenti dovunque, in qualsia tessuto, ma hanno una funzione completamente diversa dalle cellule staminali embrionali.
Queste, infatti, servono per mantenere l'omeostasi tissutale, per mantene il rinovo dei tessuti, il trunover.
Anche queste sono completamente indifferenziate, vanno incontro sia ad autorigenerazione con divisione simmetrica, che a differenziamento con divisione asimmetrica.

Anche nel tessuto nervoso ci sono due regioni in cui si ha il turnover di neuroni dovuto a queste cellule.
Queste cellule staminali somatiche non sono però facilme individuabili, poiché non sempre si dispone di marcatori che permettano di caratterizzarle per isolarle.
Inoltre, tali cellule possono essere più o meno attive nell'organismo, si va da situazioni di alto turnover come ad esempio nel sangue, a quelle di basso, come ad esempio nei tessuti nervosi.

In qualsiasi situazione, la capacità di dividersi è affidata soprattutto alle cellule proliferatrici in transito, e sono loro che garantiscono il turnover, la cellu stamina svolge la funzione di dare la divisione asimmetrica.
Ciò avviene perché la cellula stamina rimane in quel tessuto per sempre, per garanti l'omeostasi, mentre quelle proliferative vanno incontro a differenziamento definitivo e poi vengono distrutte.
Data la loro perennalità, la cellula staminale cerca di fare meno divisioni possibili, poiché più divisioni effettu, più aumenta la probabilità di acquisire mutazioni.
Le cellule stamina adulte si differenziano solamente nelle cellule del tessuto in cui sono situate, quindi è capace di differenziarsi in un numero limitato di cellule che può variare in base al tipo di questo.
Anche queste possono essere cresciute in vitro, ma non hanno stesse potenzialità delle embrionali dato che già in vivo tendono a dividersi il meno possibile.

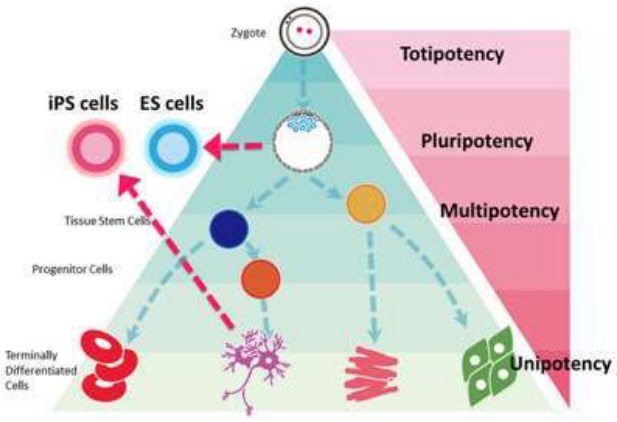
Nicchia: è il microambiente dove la cellula staminale vive, riguarda soprattutto quelle somatiche, poiché la nicchia di quelle embrionali è la blastocisti.
È un qualcosa di composito, dove la cellula staminale riceve informazioni, le quali possono venire o da cellule nei bressi della nicchia, quindi essere informazioni a breve raggio, oppure possono essere informazioni a lungo raggio, che danno informazioni diverse, correlate con tutto l'organismo.
Le informazioni a breve raggio arrivano mediante segnalazioni di cellule non staminali intorno alla nicchia, quelle a lungo raggio sono invece a carico della via nervosa, oppure della via sanguigna.
Si ha quindi una via veloce ed una lenta.

CELLULE PLURIPOTE INDOTTE

Fino a poco tempo fa si pensava che il processo di differenziamento fosse una strada a senso unico, cioè la cellula progenitrice si differenzia e da tipi cellulali diversi.
Invece c'è una visione diversa emersa negli ultimi anni, cioè che in realtà è possibile anche fare la strada inversa, ovvero le cellule differenziate si possono far tornare cellule staminali pluripotenti.
Si sta cercando di arriva anche allo stato totipotente.
Ciò ha permesso di ottenere le cellule pluripotenti indotte.

Negli anni si è imparato a prende una cellula somatica, non staminale, e riprogrammarla geneticame in modo da farla comportare come una cellula staminale embrionale.
Queste cellule coltivate possono essere inodtte a differenziarsi nei tipi cellulare che si vogliono/servono.
Con tale metodo non c'è più bisogno degli embrioni in eccesso, risolvendo così i problemi etici.
Inoltre con tali colture si risolve anche il problema dei trapianti con cellule eterologhe, poiché si hanno così trapianti autologhi, ed il sistema immunitario non reagisce.

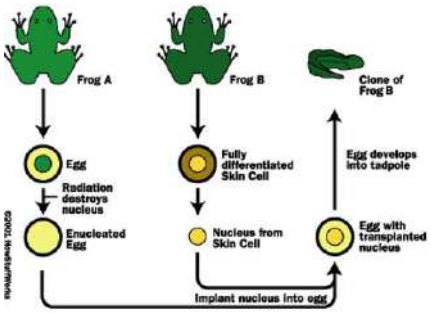
RICAPITOLANDO: Le cellule staminali totipotenti sono negli embrioni fino al compattamento della morula, dopo di che diventano pluripotenti.
Da qui si posso prelevare e mettere in coltura le cellule staminali embrionali.
Dopo la gastrulazio le cellulle pluripotenti diventano multipotenti, capaci di dare solo cellule del tessuto in cui sono situate, da queste si ottengono cellule completamente differenziate dette unipotenti.
Con le nuove competenze, ora, dalle cellule completamente differenziate si è in grado di riottenere cellule pluripotenti, con le caratteristiche delle cellule staminali embrionali, che essendo state modificate arificialmente sono dette cellule staminali pluripotenti indotte (IPSC).



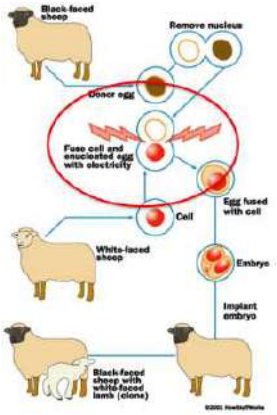
CLONAZIONE

I primi esperimenti di riprogrammazione cellulare furono eseguiti da Yamanaka, ma tali esperimenti furono poaaibili grazie agli studi fatti da un altro scienziato, Sir Gurdon, il quale dimostrò che si può clonare.

Sir Gurdon, con i suoi studi, ha dimostrato che è possibile clonare per trasferimento du un nucleo di una cellula somatica in un ovocita anucleato.
Tale trasferimento vuol dire trasferire un nucleo con della eucromatina ed eterocromatina già formata, quindi con geni già attivati/disattivati, e far tornare questo ad uno stato indifferenziato.
I suoi esperimenti furono su degli anfibi, sulle rane.



Egli tolse il nucleo da un'ovocita di una rana, prese poi un'altra rana diversa che permetteva un riconoscimento fenotipico, e da una cellula della pelle di questa recuperò un nucleo, il quale lo inserì nell'ovocita.
L'inserimento permise lo sviluppo di embrioni che formarono dei girini, e per far ciò il nucleo si deve essere riprogrammato poiché ha dato origine ad un organismo completo, con le caratteristiche della seconda rana.
Dopo anni si dimostrò che ciò era possibile anche nei mammiferi, con l'esperimento della pecora Dolly, usando lo stesso principio di Gurdon negli anfibi.



Si prese una pecora con il muso nero ed una con il muso bianco, si rimosse il nucleo dall'ovocita della pecora con il muso nero, e vi si inseri un nucleo della pecorsa con il muso bianco, si fece sviluppare la blastocisti, e la si inserì in una pecora incubatrice avente il muso nero.
Si ottenne così un agnello dal muso bianco, come la pecora che aveva donato il nucleo somatico, tale agnello fu denominato "la pecora Dolly".
Il problema che emerse è che dovettero fare vari tentativi prima di ottene un risultato, questo sia perché la riprogrammazione è un evento abbastanza complesso, e non si sapeva molto su come poteva avveni, sia perché prima non si sapeva neanche molto su come impiantare una blastocisti in un utero.
Si usarono due sistemi differenti di trasferimento del nucleo somatico nell'ovocita:

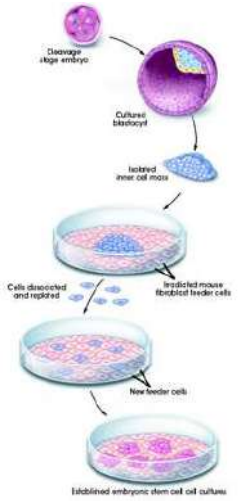
1. per fusione delle due membrane;
2. per iniezione diretta.

La riprogrammazione è a livello epigenetico, non è soltanto un cambiamento di trascrizione, ma un cambiamento totale del patrimonio ereditario.
Al giorno d'oggi si clonano senza problemi animali come topi, perché le metodologie si sono evolute e migliorate nel tempo.
È possibile anche clonare animali da compagnia, magari da cellule del vecchio animale deceduto.
Queste capacità ha però creato numerosi problemi etici, perché si possono clona anche blastociti, tale clonazione infatti è permessa ed usata per scopi terapeutici, per terapie geniche o per avere cellule di ricambio, ma non è permessa a scopo rproduttivo, non si può clonare un intero individuo.
La clonazione di cellule umane per terapie si può fare facilmente, si prende il nucleo da una cellula somatica, si inserisce in un ovocita anucleato fermo in metafase II, e dopo tale inserimento il nucleo si attiva e completa la meiosi, formando così lo zigote che a sua volta porta alla formazione della blastocisti.
La clonazione riproduttiva è ammessa solo per animali da compagnia, e per la propagazione di animali transgenici che magari si usano per produrre farmaci ricombinanti.

Tutti questi cloni hanno DNA nucleare che deriva dal nucleo della cellula somatica, ma nelle cellule è presente anche un altro DNA, quello mitocondriale e che deriva dalle cellule della madre, quindi dall'ovocita.
Ciò può essere utile nel caso di malattie su base mitocondriale, poiché così si ha la possibilità si cambiare i mitocondri.

Da tali studi sulla clonazione, si è arrivati al fatto che l'ovocita contiene dei fattori per la riprogrammazio, tale informazioni furono poi sfruttate da Yamanaka.

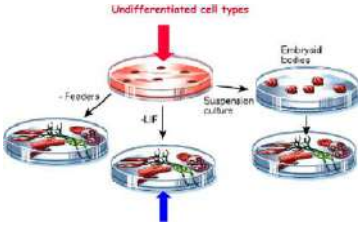
CELLULE STAMINALI EMBRIONALI



Si prendono dalla massa interna della blastocisti.
Sotto la colonia di cellule in coltura vanno messe delle altre cellule diverse, i fibroblasti murini inattivati, che producono un qualcosa che permette il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali.
Questo substrato funziona benissimo sia per le cellule staminali embrionali di topo, che per quelle umane.
Vari studi hanno fatto però in modo di poter sostituire questi fibroblasti, nelle colture di cellule umane, con del matrigel.
Con degli esperimenti biochimici sul medium di coltura, ci si è accorti che la presenza di questo poteva essere sostituita da una citochina, LIF, e che con questa le cellule restavano comunque pluripotenti, ma solo per quanto riguarda le cellule di topo, pe le cellule umane non funzionava.
Nelle cellule uomane occorre il matrigel, una miscela gelatinosa, con proteine della matrice e dei fattori di crescita estratti e purificati dal sarcoma di topo.

Queste cellule staminali hanno un ampio potenziale di sviluppo, possono differenziare in tutti i tipi di tessuto, hanno un'alta clonalità, ovvero un elevata capacità di formare colonie, e in coltura, nelle condizio appropriate, sono immortalizzate, ovvero si autorinnovano.
Una delle caratteristiche principali è che sono completamente indifferenziate, non hanno zolle di eterocromatina, se non delle parti costitutive, infatti il loro nucleo è quasi completamente eucromatico, ed è molto grande.
Inoltre hanno un nucleolo anch'esso molto grande, ed un citoplasma scarso, completamente indifferenziato.
Le cellule staminali embrionali sono tutte pronte a scattare, deve essere tutto pronto perché venga fatto tutto velocemente, sia in caso di rinnovo che di differenziamento, non sono delle cellule silenti.
Quando vanno incontro a differenziamento, si nota l'ingrandimento del citoplasma, il nucleo si rimpicciolisce, e si iniziano a vedere le zolle eterocromatiche, che corrispondono all'inattivazione di alcune zone, lasciano attive solo quelle che servono in base al tipo di differenziamento.

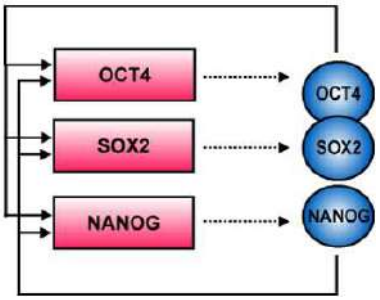
Per controllare che queste cellule pluripotenti si possono fare delle prove:



- in vitro: si induce un differenziamento a caso.
  O si tolgono le feeders cells (fibroblasti inattivati), per far avvenire ciò, oppure le LIF, per vedere se senza questi substrati vanno incontro a differenziamento random.
  Altro modo è di evitare che aderiscano al substrato, in tal modo queste colonie cambiano conformazione e diventano come tante palline, corpi embrioidi, e facendo l'analisi istologica di questi si dovrebbero trovare tutti e tre i foglietti embrionali;
- in vivo si può verificare in due modi, tramite:
  1. formazione del teratoma: queste cellule se messe sottocute ad un topo immunodepresso producono tumori, che prendono il nome di teratoma.
     Sono tumori che riflettono le caratteristiche pluripotenti delle cellule staminali, ovvero il tumore che si produce contiene tipi cellulari di tutti e tre i foglietti embrionali, ci può quindi trovare dalle ossa ai denti, perché la cellula si divide in maniera casuale dando gli stessi differenziamenti che avrebbe dato in vivo, ovvero le strutture dell'embrione;
  2. formazione di chimera: le cellule staminali cresciute in coltura possono essere inserite per iniezione in una blastocisti, che non risente ne dell'aggiunta ne del prelievo di cellule, devono essere però delle cellule staminali embrionali.
     Questa blastocisti si può impiantare nell'utero di una topolina pseudogravida, ovvero una topolina che è stata sottoposta a stimolazione ormonale prodotta da un accoppiamento con topi maschi vasectomizzati.
     Questa blastocisti ha cellule che derivano da due coppie di genitori diversi.
     Se si aveva una coppia di genitori bianchi, ed una coppia di genitori neri, i topi derivanti dalla blastocisti chimerica saranno dei topi bianchi e neri.

Quando si vanno ad analizzare queste cellule sappiamo che sono cellule immortalizzate perfettamente diploidi, non hanno genomi alterati.

Qual è la base della pluripotenza?



I geni che si devono esprimere per mantenere un certo livello di espressione sono fondamentalme 3, e sono 3 fattori di trascrizione.
La pluripotenza è quindi una poprietà intrinseca della cellula.
Questi geni fondamentali sono:

- CT4;
- SOX2;
- NANOG.

Questi fanno parte di un circuito autoregolatorio, cioè ciascuno di questi regola un circuito di target, ma regola anche l'espressione di se stesso e degli altri due geni.
Appena questo circuito autoregolatorio si altera, la cellula ne risente e va incontro a differenziamento.

DIAPAUSA

La diapausa è una condizione di arresto temporaneo dello sviluppo che avviene nelle topine gravide.
Questo di ha nella fase tardiva della blastocisti, l'utero non è reattivo per l'impianto della blastocisti, e quest'ultima non è quindi in grado di svilupparsi.
Ciò può essere indotto anche sperimentalmente abbassando l'estrogeno circolante.
Le cellule del trofoblasto, per mantenere la loro pluripotenza, producono una molecola detta LIF, e tale produzione si ha fino al momento in cui avverrà la gastrulazione.
Nell'uomo ciò non avviene.

Nel topo esistono due momenti particolari in cui si possono prende le cellule stamina embrionali, uno è il momento del pre-impianto, stato naive o stato ground, e produce cellule che rispndono a LIF.
Nel momento in cui la blastocisti entra nell'utero qualcosa cambia in queste cellule, appena impiantate, un attimo prima che inizi la gastrulazione, queste cambiano ed assumono uno stato transiente, vengono dette epistan cells.
Queste epistan cells dei topi rispondo come rispondono le cellule umane.
Sia le cellule staminali embrionali del pre-impianto che rispondono a LIF, sia le epinstan cells sono pluripotenti, ma rispondo a diverse segnalazioni.

LIF: Segnalazione che induce uno stato di arresto temporaneo della blastocisti prima dell'impianto, dovuta ad una soppressione della produzione degli estrogeni, che rende l'utero non recettivo per l'impianto.
LIF è essenziale per l'impianto in utero.

Topi LIF-/- si sviluppano normalmente e sono fertili, ma non portano a termine le gravidanze, non riescono ad effettuare l'impianto della blastocisti nell'utero.
LIF è espresso nel trofoblasto e il recettore nelle cellule dell'ICM.

Queste cellule, se differenziate, si possono impiantare ma essendo eterologhe vanno trattate per evitare la risposta del sistema immunitario.
In vitro possono essere utili per testare farmaci o metodi di ingegneria genica per fare correzioni geiche.

INDUZIONE PLURIPOTENZA

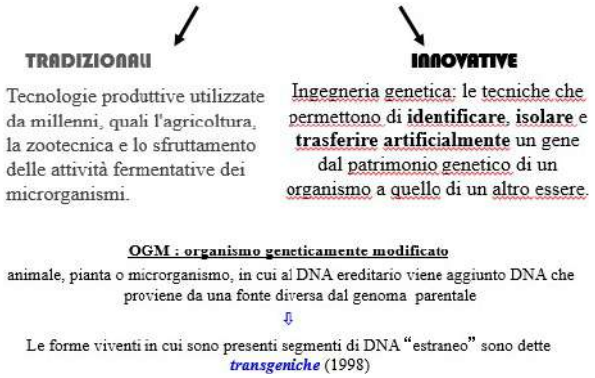
Fattori trascrizine master = che condizionano l'identità di una cellula.

Si prendono cellule somatiche di un organismo e si mettono in coltura, questa coltura è una coltura finita di fibroblasti diploidi, e si deve trovare un qualcosa che trasformi l'identità di queste cellule da somatiche a staminali pluripotenti.
Si coltivano i fibroblasti, si inseriscono dei geni estranei facendo delle infezioni retrovirali, se non ha funzionato nulla questi muoiono, se invece le feeders cells funzionano si vedrà crescerle come colonie.
Si trovarono quindi in queste piastre colonie di cellule staminali simili alle cellule staminali embrionali.

Come si procedette sperimentalmente:
Il tutto fu fatto da Yamanaka per la prima volta.
Si presero dei geni espressi in maniera spacifica dalle cellule staminali embrionali, correlati a tumori o divisionni cellulari.
Si fece selezione con un certo rischio, perché potevano anche non essere quelli adatti, e si riuscì a mettere insieme 24 geni da testare.
Si creò un costrutto di Fbx15, target di OCT4.
Si modificò geneticamente un topo, in modo da sostituire Fbx15 endogeno con una cassetta di espressione dove Fbx15 è legato alla β-galattossidasi e neoR.
A questo topo transgeico si tolsero poi i fibroblasti e si misero in coltura, queste sono delle cellule differenziate, quindi non esprimono Fbx15.
Si fece un'infezione retrovirale su questi fibroblasti con tutti e 24 i geni, e si fece selezione con G418, in modo da ammazzare tutte le cellule senza Fbx15 costrutto che conteneva anche neoR.
Si trasferirono quelle rimaste e si misero su feeders cells, con altri test si andò a vedere se queste esprimevano anche la β-galattossidasi.
Se si esprime Fbx15, vuol dire che si sono riprogrammati i fibroblasti a cellule pluripotenti.
Una volta ottenuti dei risultati positivi, si iniziò ad infettare ogni volta togliendo sempre un gene diverso, poiché 24 geni erano troppi.
In alcuni casi il fattore tolto risultava fondamentale poiché non cresceva più nulla, in altri la crescita si aveva comunque quindi poteva esere eliminato, e si arrivò così a rimanere con un totale di 10 geni fondamentali.
Si ripeté il togliere un fattore per volta anche da questi 10 geni, e questa volta se ne selezionarono 4.
Si è arrivati al limite minimo per ottenere una riprogrammazione dei fibroblasti.
Tutto ciò è stato fatto nel 2006.

Dal 2006 ad oggi sono stati fatti altri passi da gigante.
Si è visto che si possono usare fattori di crescita diversi, e si è visto che si possono ridurre anche a 3, inoltre si è visto che si può riprogrammare anche senza fattori genetici, ma utilizzando fattori chimici.
Altre ricerche hanno messo in evidenza altre strade, ad esempio il non riprogrammare la pluripotenza, ma il riprogrammare direttamente una cellula differenziata in un altro tipo di cellula, in tal caso si parla di riprogrammazione diretta.

BIOTECNOLOGIE



Le biotecnologia innovatvei sono un campo che ha preso un po' tutti gli aspetti delle biotecnologie, da quelle che riguardano la salute, all'alimentazione, all'inquinamento.
Ad esempio nelle biotecnologie bianche, che sono quelle che si occupano della bonifica ambientale, si è sviluppato un rimedio per la fuoriusci di petrolio sfruttando un microrganismo modificato geneticamente che è ingrado di degradare gli idrocarbiuri.
Altro aspetto molto importante di queste biotecnologie è lo sviluppo dell'ingegnerizzazione di animali acquatici, o il prelievo di particolari geni da questi per inserirli in altri organismi.
Tramite questi lavori su questi animali, ad esempio, si può ottenere un miglioramento per la richiesta mondiale di cibo creando pesci transgenici di dimensioni maggiori.
La GFP è l'esempio eclatante di come una proprietà presente in un organismo marino è diventata uno strumento fondamentale nel campo biotecnologico.

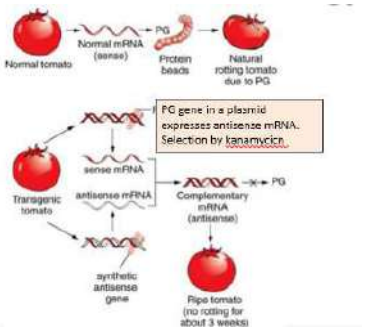
BIOTECNOLOGIE ALIMENTARI

Per quanto riguarda i miglioramenti nell'ambito bioalimentare, nei mammiferi si hanno troppe complicazioni, come ad esempio dei cedimenti musculori, ma nelle specie acquatiche funzionano senza problemi.
È stato ottenuto e brevettatto un salmone transgenico, uno dei primi animali di questo tipo.
Questo pesce è tre volte più grande di quello selvatico, questo è dovuto al fatto che in quello selvatico la crescita si ha quando è attivo l'ormone della crescita, e in tali salmoni quest'ormone è attivo solo in estate.
Nel salmone transgenico, invece, è stato inserito il gene dell'ormone della crescita posto sotto il gene promotore di quello dell'anguilla, che è attivo sempre, tutto l'anno.
Con l'inserimento di tale promotore si ha così una crescita continua, e quindi un slmone di dimensioni maggiori.
Tali salmoni sono abbastanza facili da ottenere perché le uova che depositano sono tante, a fecondazione esterna e quindi abbastanza facili da poter modificare.
Questi pesci più grandi sono considerati animali transgenici, e seco la regolamentazio americana, gli animali transgenici devono essere considerati come i farmaci, ed hanno quindi bisogno di ottenere varie approvazioni prima di poter essere messi sul mercato.
In Italia non si possono produrre tali animali, però si possono acquistare.

Esistono però dei rischi nel produrre tali animali, che si posso generalizza a tutti i vari animali.
Il rischio è che ci sia una competizione tra questi e quelli naturali, quindi per evitare ciò vanno cresciuti ed allevati in ambienti protetti, poiché questi sono più grandi e crescono prima di quelli naturali, quindi avrebbero sia una competizioni per il cibo, che per la riproduzione, ma spesso tali animali sono sterili.
Essendo sterili, chi vuole allevare tali animali è dipendente dall'azienda produttrice, poiché ogni volta vanno ricomprati.

BIOTECNOLOGIE VERDI

I progressi migliori sul miglioramento alimentare si sono ottenuti nelle piante, la prima pianta transgenica è stata prodotta nel '94 ed era un pomodoro un po' più grande di quelli standard, ma con la caratteri che marcisce molto lentamente.
La degradazione del pomodoro è dovuta ad un enzima, il quale dissolve la peptina nella parete cellulare, utilizzando la tecnologia dell'RNA anti-senso si prese un pomodo normale, e si fece esprimere un plasmide che esprimeva tale RNA.
In questi pomodori si ha così il gene endogeno che produce un RNA senso, che produce l'enzima, ed il plasmide che produce l'RNA anti-senso complementare al filamento di RNA senso.
A questo punto si ha un RNA a doppio filamento che entra nella via del RNA inter-clearence, e si ha cosi un knock down di tale messaggero.



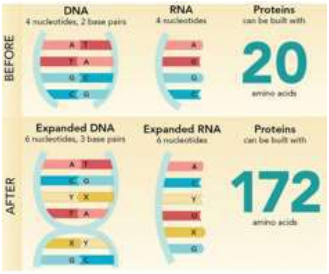
Ciò porta ad un espressione estremame ridotta di tale enzima di degradazione.
Tali organismi furono approvati dopo essere stati sottoposti a controlli sui valori nutrizionale e ad analisi sulle sostanze che producono.

Il riso d'orato è un'altra storia collegata ai miglioramenti genetici che possono esse utili all'uomo.
Uno dei porblemi più grossi nelle popolazio povere è la carenza di vitamina A, così si ha avuto l'idea che di far aumentare il contributo di tale vitamina in alcuni prodotti alimentari, e per facilità di produzione e quantità, si è scelto il riso.
Si fece in modo di produrre vitamina A nel riso sottoforma di pro-vitamina A, che il riso da solo non la produrrebbe perché non ha alcuni enzimi per la biosintesi di questa.
L'idea fu quella di introdurre tali geni per gli enzimi, e si ottenne così un riso arricchito di pro-vitamina A, molto più utile per nutrire le popolazioni nel terzo mondo.

BIOLOGIA SINTETICA

Un aspetto che sta emergendo è la vita artificiale, un innovazione ancora più avanzata, ed il settore che se ne occupa ha preso il nome di biologia sintetica.

Si sta cercando di costruire organismi viventi con un genoma non presente in natura, sostituendo tutto il genoma, e creando così un organismo nuovo.
Si potranno ottenere in tal modo proteine nuove che si potranno utilizzare in vari campi.
Tutto ciò nasce con un lavoro del 2014, dove è stato ottenu un organismo semi-sintetico con un alfabeto genetico espanso.
Ovvero il codice genetico classico è forma da 4 basi, e le varie combinazioni di queste in triplette producono 20 amminoacidi diversi da cui si ottengono poi migliaglia di proteine.
L'ampliamento dell'alfabeto genetico consiste nell'inserire nuove basi nel genoma.



In E. coli inserirono un gene, identificato nelle microalghe, che è capa di aggancia quete nuove basi nel mezzo di coltura e trascinarla dentro la cellule per renderle disponibili ad essere inserite nel DNA.
Per ora le basi che si stanno sperimentando non codificano nulla, ma l'inserimento di basi funzionanti porterebbe ad un genoma con tre coppie di basi invece che due, si avrà ad esempio A-T G-C X-Y, e ciò comporterebbe che al osto di 20 amminoacidi si passerebbe a 172 potenziali amminoacidi, con la conseguenza di tutta una gamma di proteine da scoprire, con magari nuove funzioni.

ANIMALI TRANSGENICI

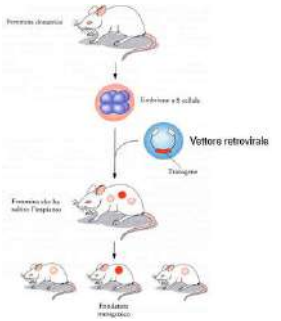
Per clonare si può o fondere le membrane di ovocita anucleato e cellula somatica, oppure iniettare direttamente il nucleo della cellula somatica dentro tale ovocita.
La clonazione può inoltre essere sia riproduttiva che terapeutica, la seconda è usata per produrre blastocisti da cui prende cellule staminali, la prima è importante quando si hanno gli animali transgenici, che devono essere mantenuti , ma che sono sterili.

Per ottenere animali modificati, bisogna inserire i geni d'interesse il più precocemente possibile.
Esistono tre diverse metodologie però che permettono di ottenere questi animali modificati:

1. vettori retrovirali, capaci di infettare le cellule embrionali prima dell'impianto in una femmina ricettiva;
2. microiniezione del DNA nel pronucleo maschile di un uovo fertilizzato;
3. introduzione di cellule staminali geneticamente manipolate in embrioni prima dell' impianto nella femmina ricettiva.

In tutte le progenie che si ottengono dalle varie metodiche si deve sempre fare un controllo facendole incrociare con un individuo della stessa specie wild type.
Si selezionano poi gli individui con mutazioni nelle linee germinali, detti fondatori transgenici, e facendoli accoppiare con altri fondatori si avrà così la popolazione transgenica.

1. Vettrori retrovirali:

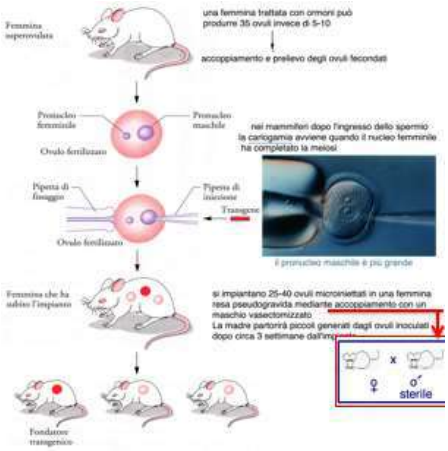


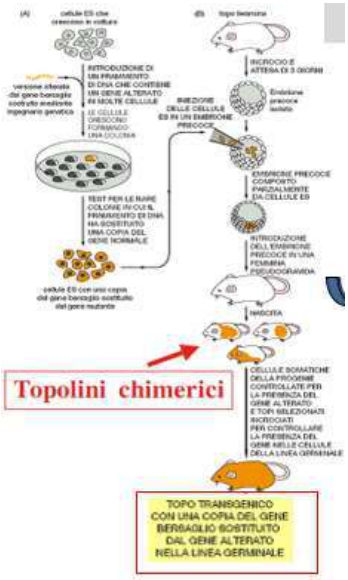
Si ha una femmina donatrice che fornisce gli embrioni, e si lavora con l'embrione allo stadio 8 cellule, le quali verranno infettate con il vettore retrovirale che contiene il transgene.
Questo si inserisce nel DNA cellulare in copie multiple e in maniera casuale.
Un limite di queste tecnologie è data dalle dimensioni ridotte del costrutto che è possibile trasportare.
Questi embrioni vengono poi inseriti in un'altra femmina incubatrice, la quale produrrà la progenie.
Si verifica quale di questi individui è il fondatore transgenico.

2. Microiniezione:

Questa metodologia da la possibilità di intervenire sul pronucleo maschile.
Al momento della fecondazione, quando il pronucleo maschile penetra la cellula uovo, prima della fusione dei due nuclei, il nucleo materno deve completare la meiosi ed emettere il secondo globulo polare.

Durante questo periodo di completamento, il pronucleo maschile è li ed aspetta, e questo tempo di latenza è importante poiché da modo di inserire il gene estraneo nel pronucleo maschile, che è piu grande di quello femminile.
Quando si inietta il transgene, si deve iniettare anche una minima quantità di liquido, ma quest'ultimo produce dei piccoli danni nel pronucleo, dei nick nel DNA.
Ma ciò è utile perché nel frattempo si è inserito il DNA estraneo, in forma lineare e senza plasmide.
Essendoci questi nick, quando avviene la riparazione questo DNA lineare può casualmente inserirsi nei tagli.
Dopo la riparazione, il pronucleo maschile si fonde con quello femminile, e si ha così lo zigote con il transgene.





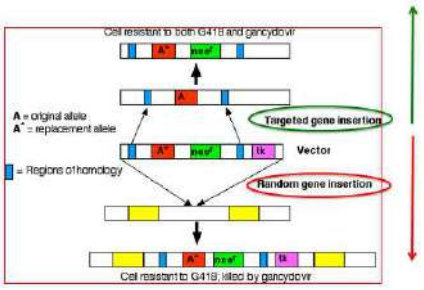
Anche in qst caso non si sa ne quante copie si hanno, ne dove si integrano.
Gli aspetti importanti sono che in questo caso non ci sono limitazio di dimensioni.
Questo zigote si fa sviluppare in vitro fino allo stadio di blastoci, e poi si impianta nell'utero di una femmina pseudogravida.

3. Blastocisti:

Si possono prelevare delle cellule staminali dalla massa interna della blastocisti, e farle crescere in coltura, e modificarle gemeticamente.
Tale modificazioni possono essere effettuate mediante gene targeting, per avere un inserzione mirata, e poi fare una selezione per ottenere nel terreno di colture solo le cellule d'interesse dove tale procedimanto è andato a buon fine.
Si prendono altre blastocisti, e in queste si iniettano le cellule della blastocisti precedentemente selezionate, si avranno così delle blastocisti chimeriche.
Si impiantano in una madre incubatrice, e si ottiene una progenie chimerica.
La differenza con le altre metodologie è che qui si ha un inserimento mirato, si puo quindi andare a fare un knock-out o un knock-in di un determinato gene.

GENE TARGETING

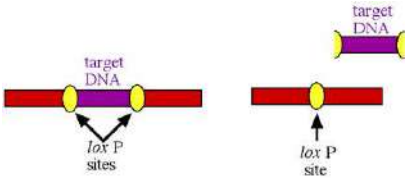
Permette di fare un inserimento in maniera controllata, creando a monte e valle della cassetta di espressione due regioni di omologia.
Per assicurarsi che queste si siano inserite in modo mirato, a valle e a monte di queste cassette di espressione si inseriscono i geni della timidina chinasi.
Se l'inserimento avviene in modo mirato, tali geni della timidina restano all'esterno, non vengono inseriti, se invece non è mirato, possono essere inseriti anche questi geni.
Si controlla se l'inserime è avvenuto correttamente tramite selezioni positive/negative.



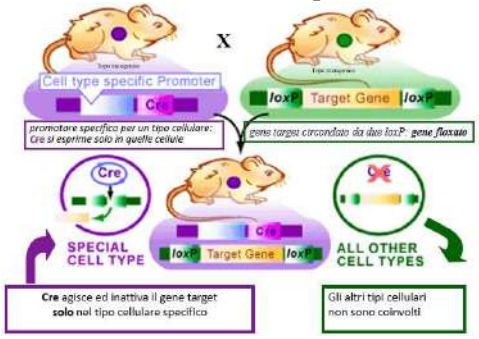
Tale procedura ha però dei limiti:

- l'assenza della funzione colpita da mutazione durante le fasi di sviluppo può risultare letale precludendo lo studio di funzioni possibili negli stadi iniziali e successivi a quello letale;
- molti geni svolgono funzioni multiple in vari tipi di cellule durante l'ontogenesi e fase post-natale, questo provoca fenotipi complessi e complica l'individuazione di cellule anomale prodotte da fenomeni con più cause;
- l'effetto di una mutazione può essere compensato durante lo sviluppo e così manca il fenotipo alterato nell'animale adulto;
- per famiglie di geni si devono mutare più geni della stessa famiglia per prevenire la ridondanza funzionale di espressione che preclude l'identificazione di una funzione di un componente della famiglia genica.

Quesi limiti possono essere superati con delle mutazioni condizionali, le quali possono agire in maniere specifica su un tessuto o in un momento specifico della vita dell'organismo.
Una metodolo per fare ciò è chiamata cre-lox, che permette di creare mutazione quando e dove si ritiene necessario.
Quasta tecnica prevede l'utilizzo di un enzima virale, la ricombinasi 3, che funziona bene nelle cellule eucariote, ma in cui non è presente.
Questa agisce quando riconosce delle sequenze target, dette siti lox P, parzialmente palindromiche lunghe 34 pb che nel mezzo hanno 7-8 pb diverse, e che vanno situate a monte e a valle della cassetta d'espressione.
La ricombinasi 3 quando è attiva riconosce tali sequenze e taglia via la sequenza di DNA target contenuta tra queste lox P, e resta solo un piccolo sito loxP nel genoma.

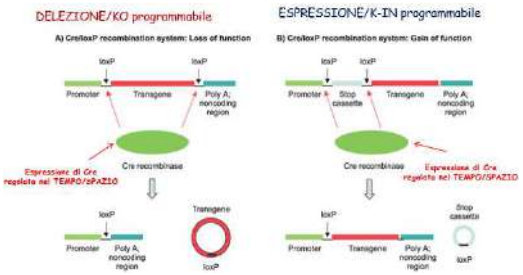


Esempio mutanti condizionali:
Il gene estraneo si può inserite facendo un topo transgenico, dove si inserisce per microiniezione la ricombinasi 3 sotto il controllo o di un promotore ubiquitario, inducibile, oppure un promotore tessuto specifico.



Si hanno così dei topi che come transgene esprimono la recombinari 3, detti topi cre.
Si costruiscono poi dei topi con il transgene che si vuole studiare, il gene target deve essere fiancheggiato dai due siti lox P, e si ha così il gene floxato, e tali topi sono detti topi lox P.
A questo punto di fanno incrociare queste due linee di topi transgenici.
Nel topino ottenuto, se la recombiansi è sotto promotore tessuto specifico, sarà espressa, e quindi attiva, solo in quei tessuti, e quindi si vedrà l'effetto solo in questi punti.
Se la recombinasi è sotto un promotore inducibile da determinate sostanze, si avrà un controllo temporale.

Si può anche fare un sistema cre-lox che permette di fare un knock in invece che un knock out.
Non si mette floxato il transgene che si vuole studiare, ma si mette floxato, in questo caso, un segnale di stop.
In tal modo fino a che non si esprime la ricombinasi 3 il gene d'interesse è bloccato da questa regione di stop.
Dal momento in cui si esprime la ricombinasi 3, il gene che prima era bloccato viene espresso, poiché la ricombinasi elimina la regione di stop.
Si ha intal modo un transgene che si esprime quando/dove si vuole.



Espressione/delezione di un gene inducibile:
Sono state prodotte proteine di fusione tra Cre e ER(T), ovvero recettore estrogeni.
La ricombinasi è confinata nel citoplasma finché non viene somministrato l'ormone sintetico che riconosce il recettore e fa traslocare la proteina di fusione con la ricombinasi nel nucleo dove Cre induce la delezione del frammento incluso tra i due siti LoxP.
In questo caso si fa un doppio crontrollo, perché Cre si mete sotto promotore tessuto specifico, mentre la proteina di fusione è ormone dipende, quindi si ha anche controllo temporale.

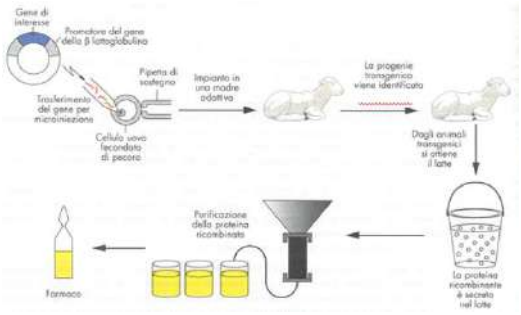
USO DEGLI ANIMALI TRANSGENICI

ambito bio-medico

1) Farmacologia	Produzione e secrezione di farmaci e prodotti biologici nel latte	topi, pecore, capre, maiali, mucche.
2) Medicina e Chirurgia	Modelli sperimentali per lo studio, il trattamento e la prevenzione di gravi malattie umane. Donatori di tessuti e organi "umanizzati" per xenotrapianti	Topi, ratti --- Suini
3) Zootecnia	Selezione ed allevamento di animali resistenti alle malattie batteriche, virali e di parassiti ex. mediante transgeni codificanti un anticorpo capace di legare un antigene specifico Miglioramento quali-quantitativo delle produzione di alimenti di origine animale (carne, latte, uova)	Bovini, suini, ovini, polli, pesci

Quando si ottiene un'animale transgenico, l'importante è evitare di ucciderlo.
Quando è possibile, infatti, si fa trascrivere il transgene in un liquido corporale che non lo uccide, ad esempio non nel sangue, ma nel latte.
Se non è possibile fare ciò, subito dopo che si è ottenuto tale animale, questo viene clonato per non perdere le modifiche apportate.

Il primo animale transgenico si è ottenuto nel 2001, ed era un maiale in cui nel latte era stata ottenuta la produzione della proteina C.
Da questo latte si potevano estrarre dai 40 a 1'200 μg per ml di proteina C umana purificata, una proteina importante per le terapie.
Si è poi passati alla pecora, poiché da questa se ne ricavavano 10 g per litro, e in un ciclo di lattazione una pecora produce dai 250 ai 280 litri.
Ed infine l'idea successiva fu quella di usare le mucche, che producono 1'000 litri di latte annui, con una resa di 1 g di proteina per litro, ed ottenendo così con solo 20 mucche transgeniche circa 100 kg annui di proteina.



In genere quando si vuole ottenere un prodotto si fa transgenesi con vettori, dove il gene di interesse si mette sotto un promotore specifico, ad esempio in questo caso sotto un promotore che si esprime nel tessuto mammario e basta.
La strategia non cambia, si inserisce il gene per microiniezione nel pronucleo maschile, e la blastoci si impianta ed esprime in madri incubatrici.
In tal modo si ottiene un prodotto puro estraendolo dal latte, poiché non c'è tessuto animale contaminante.

Il toro fu il primo animale transgenico in grado di portare la lattofferina umana, e da questo si sono ottenuti, attraverso incroci, tutta una serie di bovini altrattanto in grado di produrla.
Queste proteine purificate hanno caratteristiche uguali alle wild type umane.

FARMACI DA ANIMALI TRANSGENICI

Per quanto riguarda i farmaci, il primo approvato e messo in commercio fu Atryn, il quale contiene anti-trombina ricombinante, un anti-coagulante ottenuto da una capra.
Questo è stato approvato nel 2006.
Altro farmaco approvato e commercializzato è Ruconest, nel 2011, si produce un inibitore ricombinante di un esterasi, ottenuto da conigli, e cura un angioedema ereditario.
È una malattia che provoca dei gonfiori nella cute, nelle mucose ed anche negli organi interni, e può portare a morte.
Oggi ce ne sono tanti messi in commercio.

Quando si vanno a produrre questi farmaci, è importante non soltano l'animale che si usa, ma anche i promotori.
Va poi provato empiricamente se conviene mettere il gene senza o con introni, quindi se è meglio o no usarlo in forma di cDNA.
Inoltre, qualsiasi transgene inserito in un genoma tende ad essere silenziato nel tempo, quindi bisogna ottimizzare tutti gli elementi regolatori in modo che tale silenziamento avvenga il più lentamente possibile, oppure, quando possibile, che non avvenga proprio.
Bisogna anche controllare bene dove va a finire il transgene, e non sempre ciò è possibile.

Un tentativo che ancora è a livello sperimentale è quello di cercare di produrre anticorpi ricombinanti nel latte di animali transgenici.
Questi potrebbero essere usati per trattare tutta una serie di malattie, dai tumori alle malattie autoimmuni, ma per ora nessuno di questi ha ancora avuto l'approvazione.

AMBITO BIOALIMENTARE

Si cerca di avere dei miglioramenti nella qualità e nella quantità di cibo.
Si cerca di ottenere:

- crescita più rapida degli animali;
- miglioramento della qualità dei prodotti, ad esempio carne con meno grasso, latte contenente grandi quantità di k-caseina, da cui quindi si ottenga una maggiore produzione di formaggio, latte senza lattosio per gli intolleranti, etc.;
- resistenza degli animali a determinate malattie, nel caso di malattie infettive si tende generalmente a creare linee più resistenti (proteine antibatteriche es. lisozima).

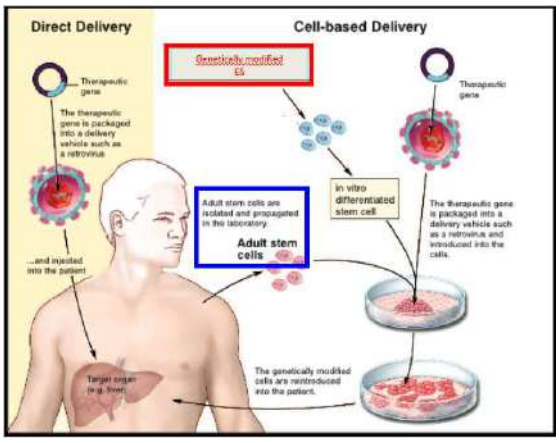
Si sono riusciti ad ottenere dei maiali ricchi di acidi con omega 3, molecola che i mammiferi non sono in grado di prodrre, e che sarebbero così salutari come il pesce.
È stato visto che esiste un enzima, fat-1, che converte gli omega 6, prodotti dai mammiferi, in omega 3.
Fat-1 è stata inserita nei fibroblasti fetali di questi maialini, i quali sono stati clonati, e si sono ottenuti cosi animalini in grado di esprimere fat-1.

Per ottenere ciò è stato creato un fattore di espressione contenente cDNA con fat-1 umano, e con espressioni regolatrici molto forti.
Si è usata anche una cassetta di espressione per verificare il marker di espressione, contenente il gene neoR.
A questo punto il plasmide con questi due geni venne trasfettato dentro le cellule dei fibroblasti di questi maialini.
Si selezionarono le cellule trasfettate mediante g418, si raccolsero le colonie g418 positive, che resistettero a tale espressione.
Si trasferì il nuclo di questi fibroblasti contenenti il transgene, e si aspettò che si svilupparono le blastocisti.
Queste vennero trasferite in madri incubatrici che portarono avanti 12 gravidanze, di cui 5 andarono a ternime.
Sono maialini clonati aventi il gene umano fat-1.
Si fecero dei controlli prendendo pezzi di DNA dalla coda di questi, e 6 di 10 maialini risultarono positivi per tale gene.

Non è cosi facile invece quando si vogliono ottene animali piu grandi.
Ci sono tutta una serie di problematiche che insorgono nei mammiferi, è vero che crescono di più e con meno grasso, ma sorgono problemi come letargia, metabolismo del glucosio disturbato, muscoli ed articolazio deboli.
Questi tentativi furono infatti abbandonati.

TERAPIA GENICA

Ci sono delle malattie che possono essere curate con tecnologie transgeniche.
Queste possono essere attuate in vivo, oppure in vitro in cellule staminali che poi vengono inserite nel paziente.
La differenza sta nel fatto che, mentre la spedizione diretta è più o meno temporanea, le cellule di ricambio possono avere durata più lunga, ed avere un effetto più efficiente.
Le cellule modificate sono però delle cellule prese da un altro organismo, poiché in un adulto le cellule staminali non sono presenti.
Per evitare risposte del sistema immunitario, le cellulce staminali di altri organismi possono essere sostituite con cellule pluripotenti indotte.
Si prende del connettivo dal paziente, si coltivano i fibroblasti, si modificano, si riprogrammano a pluripotenti, e poi, poiché non possono essere trapiantati in questo stadio perché indurrebbero tumori, vengono fatti differenziare nel tipo di tessuto necessario.



Ci sono dei problemi di applicazione in tale terapia in entrambe le vie, diretta e non.

Uno di questi è che bisogna ottenere molti vettori, bisogna tenere conto anche del tipo di vettore che si sceglie in base al tipo di tessuto, bisogna stabilire se serve un effetto transiente o stabile, bisogna valutare la capacità del vettore di riconoscere le cellule target.
Oltre a tutto ciò, comunque sia queste strategie producono risposte da parte del sistema immunitario che bisogna cerca di ridurre il più possibile, ma che non si possono evitare.
I problemi dei retrovirus in queste applicazioni è che non si possono inserire dei geni troppo grandi, inoltre sappiamo che questi si integrano ma non è possibile prevedere dove, e inoltre è difficile ottenere quantità che permettono il trattamento.
Hanno anche dei vantaggi, ad esempio inserendosi nel genoma danno effetti che durano abbastanza a lungo, ma si integrano solo in cellule in divisione, in cellule quiescenti bisogna utilizzare i lentivirus.
Gli adenovirus non si integrano, quindi danno espressioni transienti, possono avere geni più grandi ma non di dimensio elevatissime, ma è facile ottenerne grandi quantità.
Hanno una capacità di infezione elevata, vengono usati per trattare malattie che ad esempio portano alla produzione di muco.
Inoltre, poiché sono immunogeneci, possono essere trasferiti via areosol, e per via sistemica in generale.

Queste terapie, prima di essere approvate, devono superare varie fasi, che sono le medesime che si utilizzano per lo sviluppo e l'approvazione di farmaci.
Secondo tale metodologia, uno studio clinico si articola in quattro fasi:

- studi di fase I: primo studio condotto nell'uomo, solitamente in volontari sani o, nel caso di alcuni farmaci, su pazienti senza alternativa terapeutica.
  Definisce la tollerabilità del nuovo farmaco, allo scopo di identificarne il dosaggio e di studiarne la farmacocinetica, cioè lo studio degli effetti che i processi dell'organismo, quali assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione, hanno sul farmaco, e la farmacodinamica, cioè lo studio degli effetti biochimici e fisiologici dei farmaci sull'organismo ed il loro meccanismo d'azione;
- studi di fase II: sono studi condotti in un numero limitato di pazienti, con lo scopo di valutare l'attività terapeutica del nuovo principio attivo sulla patologia considerata, definirne la posologia e ottenerne una prima verifica di tollerabilità e sicurezza nel paziente;
- studi di fase III: sono condotti in un numero elevato di pazienti, con l'obiettivo di confermare le informazioni sull'efficacia e sicurezza ottenute negli studi di fase II.
  Inoltre, in questa fase, si ottengono informazioni sulle eventuali interazioni con altri farmaci ed alimenti e sull'insorgenza di eventi avversi;
- studi di fase IV: sono studi condotti dopo l'immissione in commercio del farmaco.
  Questi studi consentono di confermare la validità del farmaco nella sua reale applicazione nella pratica clinica quotidiana e di confrontarne il rapporto rischio/beneficio rispetto agli altri farmaci utilizzati nella patologia in questione.

Per garantire che i diritti dei pazienti siano salvaguardati e, soprattutto, che i pazienti non incorrano in alcun tipo di rischio, prima di attuare qualsiasi sperimentazione clinica, ogni protocollo sperimentale viene accuratamente valutato dalle autorità competenti composte sia da personale medico che non medico.
È indispensabile che ogni paziente, prima di partecipare ad uno studio clinico, firmi il Consenso Informato, documento che contiene tutte le informazioni riguardanti il farmaco sperimentale, le modalità in cui sarà condotta la sperimentazione e i diritti dei pazienti stessi.

Tutto ciò prende vari anni, e la commercializzazione di questi prodotti è poi soggetta a brevetto per vari anni prima di diventare libera.

XENOTRAPIANTI

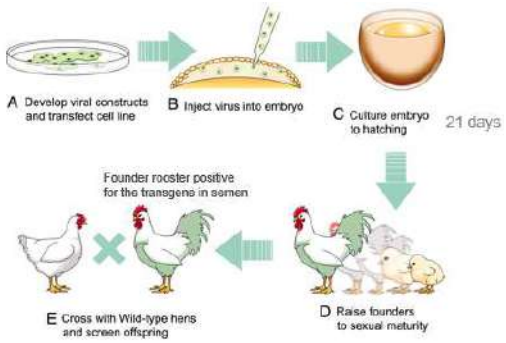
C'è dietro tanta ricerca, dove gli animali sono visti come dei donatori di organi il più possibile simili a quelli umani.
Ad esempio ci fu un trapianto di rene di scimpanze in umano e questo visse per 9 mesi, il cuore di un babuino fu trapiantato in bimba ma in questo caso il trapianto non andò a buon fine, oppure il fegato di una scimmia fu trapiantato in due pazienti ma producendo comunque proteine non umane produsse uno shock anafilattico.

In generale si usano o animali come scimmie e loro simili, oppure maiali, quest'ultimi hanno infatti un sistema immunitario molto simile a quello umano.

L'idea generale è quella di modificare questi maiali per rendere il loro sistema immunitario ancora più simile a quello umano in modo da ridurre il più possibile le risposte immunitarie ed eventuali rigetti.
Ci sono vari effetti collaterali collegati a tali trapianti, come ad esempio il diffondersi di malattie a causa di patogeni.
Va comunque tenuto conto che questi sono/sarebbero dei trapianti temporanei.
Problemi etici sono collegati al fatto che non si vuole che l'uomo usi gli animali come oggetti di ricambio.

PRODOTTI TRANSGENICI DALLE UOVA?

Le uova contengono grandi quantità di proteine, la metà dell'albume è costituita da ovoalbumina infatti.
L'uovo però non è trasparente, è qundi difficile iniettarlo e manipolarlo, inoltre la fecondanzione è interna e lo sviluppo avviene nell'ovidutto.



L'uovo fecondato impiega 24-26 ore per essere deposto.
Al momento della deposizione l'embrione è formato da circa 50.000 cellule.
I metodi più utilizzati di manipolazione genetica sono:

- Utilizzo di vettori virali;
- Recupero della proteina ricombinante nell'albume delle uova.

Si possono generare dei polli transgenici per ottenere animali transgenici dalle cui uova si recupera poi la proteina in forma pura, piuttosto che andare ad agire direttamente sull'uovo.

ALIMENTI DA PIANTE TRANSGENICHE

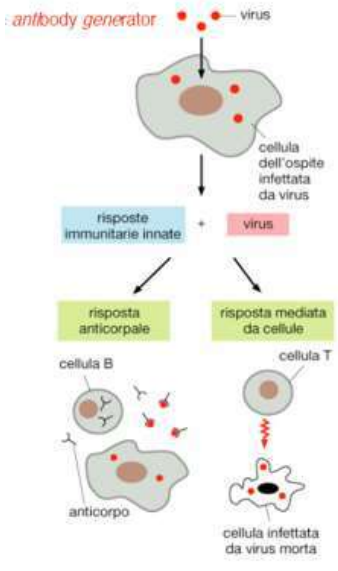
Di piante transgeniche ormai ce ne sono tante.
I vegetali transgenici sono stati ideati con il proposito di ridurre la spesa per i pesticidi e per i diserbanti.
Negli Stati Uniti viene coltivato oltre l'80% delle piante transgeniche create finora sono resistenti ai diserbanti.
I produttori di sementi stimano che, coltivando una soia resistente ai diserbanti, gli agricoltori possano risparmiare fino al 40% dei costi.
La soia transgenica al gliphosate (commercialmente noto come Roundup) contiene un gene batterico che le conferisce resistenza.
Il 30% circa delle piante transgeniche viene modificato per resistere agli insetti, significa che non può essere danneggiato da parassiti animali.
Uno dei principali nemici del mais è per esempio la larva di piralide, scava lunghe gallerie all'interno del fusto, che si indebolisce e si spezza, e della pannocchia, col risultato che non tutti i chicchi vanno a maturazione.
Il 10% circa delle coltivazioni transgeniche è resistente ai virus, e l'esempio più interessante è quello del tabacco, la prima coltivazione transgenica praticata in larga scala.
Questa pianta è soggetta al virus del mosaico, che ingiallisce le foglie e ne impedisce la funzione clorofilliana.
Il gene inserito la rende resistente.
Meno dell'1% delle piante transgeniche ha caratteristiche nutrizionali particolari, la sperimentazioni effettuata finora è stata rivolta soprattutto alla possibilità di inserire nelle patate e nelle banane geni che consentono di vaccinare una popolazione senza dover ricorrere a farmaci, inserendo un gene che stimola il sistema immunitario umano a combattere i parassiti intestinali.

IL SISTEMA IMMUNITARIO

È qualcosa di complesso nei mammiferi, e svolge la sua funzione ottimale attraverso l'attaco ad agenti estranei, gli antigeni, detti anche generatori di anticorpi.
L'immunità può essere di due tipi:

- naturale;
- acquisita.

L'immunità acquisita produce gli anticorpi cme difesa.
L'immunità naturale è un immunità immediata, ha delle linee di difesa generali come la pelle, le mucose, le secrezioni, le membreane etc.



È una risposta aspecifica che intervie subito.
Quando queste linee di difesa primaria vengono superate si hanno linee di difesa secondarie come le reazioni di infiammazione oppure l'attivazione di alcune cellule specifiche come i fagociti.
Nell'immunità innata non si ha memoria immunologica, mentre in quella acquisita si.
L'immunità acquisita riconosce ed elimina selettivamente elementi estranei e microrganismi.
È in grado di distinguere differenze piccolissime tra gli stessi antigeni e presenta quattro caratteristiche fondamentali:

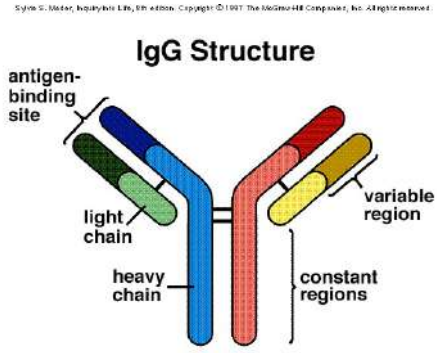
- specificità antigenica, è la caratteristica di riconoscere un antigene specifico di cui ha acquisito già la memoria;
- diversità antigenica, consiste nella capacità di generare un grande numero di fattori per il riconoscimento di miliardi di strutture molecolari presenti sugli antigeni;
- discriminazione tra self e non-self, il sistema immunitario risponde di norma solo al non-self;
- memoria.

Immunità acquisita ed immunità innata non sono indipendenti l'una dall'altra, bensì cooperano formando una rete interattiva che agisce come efficace barriera contro gli agenti estranei: i fagociti, fondamentali per la risposta aspecifica, generano segnali di pericolo, che a loro volta attivano l'immunità specifica.
Il sistema immunitario risponde allo stimolo antigenico attraverso la via cellulo-mediata e la via umorale.
L'immunità cellulo-mediata è costituita dagli elementi cellulari linfociti T e macrofagi, è un'imponente apparato difensivo contro cellule maligne, virus, funghi, batteri e si sviluppa in due fasi: fase induttiva che implica il riconoscimento e l'attivazione della risposta immune, fase effettrice con la produzione di cellule e di fattori (citochine, anticorpi, complemento) preposti al riconoscimento specifico dell'antigene.
La risposta umorale è un sistema selettivo, costituito dai linfociti B e dagli anticorpi, i quali hanno la capacità di raggiungere, riconoscere e aggredire l'antigene nella sua forma nativa, in qualunque punto dell'organismo.

Teoria della selezione clonale:
I microrganismi che si possono incontrare sono una miriade.
Si ha tutta una serie di linfoci B diversi che si producono dall'assemblamento di vari segmenti genici presenti nel genoma.
Questi linfociti prodotti non si attivano finché l'organismo non viene a contatto con l'antigene, quando ciò avvie, i linfociti B si attivano e comincia a proliferare nel midollo osseo, e producono quelle che sono le cellule della memoria, mentre altri linfociti passano nel sangue diventando plasmacellule le quali cominciano ad attivarsi e a produrre anticorpi.
Si ha cosi una difesa specifica per determinati antigeni.

ANTICORPI

Gli anticorpi possono essere di 5 classi diverse, ma quelli d'interesse biotecnologico sono solo le IgG, le immunoglobuline di tipo G, che sono quelli maggiormente presenti, sono circa il 70-80 %.



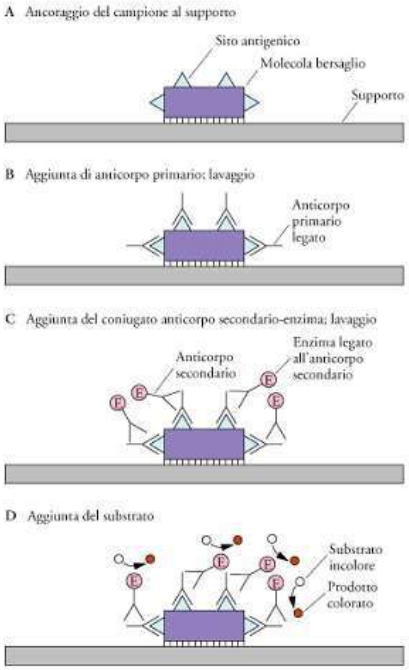
L'immunoglobuline di tipo G:
Hanno una struttura ad Y, composta da 2 catene lunghe che si legano ciascuna ad una catena breve, quindi sono formate in totale da 4 catene proteiche.
Queste catene sono costituita da una regione variabile ed una regione costante.
L'estremità della regione variabile è la parte più importante dell'immunoglobulina poiché è il sito di riconoscimento dell'antigene, mentre quella costante ha funzione di struttura, di supporto.

ANTICORPI POLICLONALI

Si legano alla stessa proteina, ma ad epitopi differenti di un antigene.
Per produrli si inietta l'antigene in un animale cavia, le cellule del midollo osseo riconoscono l'arrivo di un antigene, e attivano così la loro proliferazio e produzione di un gruppo di cellule specifiche per quell'antigene, questa è la risposta primaria.

Alcune di queste cellule che si sono attivate diventano plasmacellule, mentre altre rimarranno come cellule della memoria.
Se dopo qualche settimana si ri-inietta l'antigene, si ha il risveglio del linfociti B iniziali, ma anche delle cellule memoria, ottenendo così una risposta motlo più elevata.
A questo punto si prende il siero dell'animale e si purifica l'anticorpo.
Si sono ottenuti in questa fase tutti i vari anticorpi in grado di rispondere ai determinanti antigenici dell'antigene inietato.
Saranno quindi anticorpi che rispondono a questi determinanti specifici che sono diversi, saranno quindi anticorpi diversi prodotti da plasmacellule diverse.
Se ad esempio si sono attivati tre tipi diversi di linfociti, nel siero si avranno tre anticorpi diversi tutti però specifici per quel determinato antigene.
Il vantaggio di utilizzare anticorpi policlonali è che questi riconoscono un antigene specifico in epitopi diversi.
C'è però il rischio che uno di questi anticorpi riconoscano un determinante antigene che è in una regione conservata di altre proteine e che ci sia così un'aspecificità nella risposta.

Test di rivelazione di anticorpi nel siero:
Quando si estrae il siero da una cavia bisogna vedere se questo contiene o meno l'anticorpo, quindi vanno fatti dei test.
Uno dei più comuni è il test di rivelazione ELISA.
Tale test si esegue in vitro, si porta sul supporto l'antigene con esposti i determinanti antigenici che devono essere riconosciuti da eventuali anticorpi, e si mette il siero.
Si fa in modo che se ci sono gli anticorpi questi formino un legame.
Per vedere se ciò è avvenuto si usa un anticorpo secondario a cui è legata una molecola che ci permetta il riconoscimenti.
L'anticorpo secondario non si sceglie contro l'anticorpo primario, poiché non lo si conosce, ma si crea un anticorpo secondario contro l'animale cavia da cui si è prodotto il primario.
Ciò perché questi si creano prendendo tutte le proteine della cavia primaria e si iniettano nell'animale secondario, in modo che questo produca anticorpi contro queste proteine.
Si ha così sia un riconoscimento dell'anticorpo primario, che l'amplificazione del segnale, poiché i secondari riconosceranno più parti di quelli primari.



ANTICO MONOCLONALI

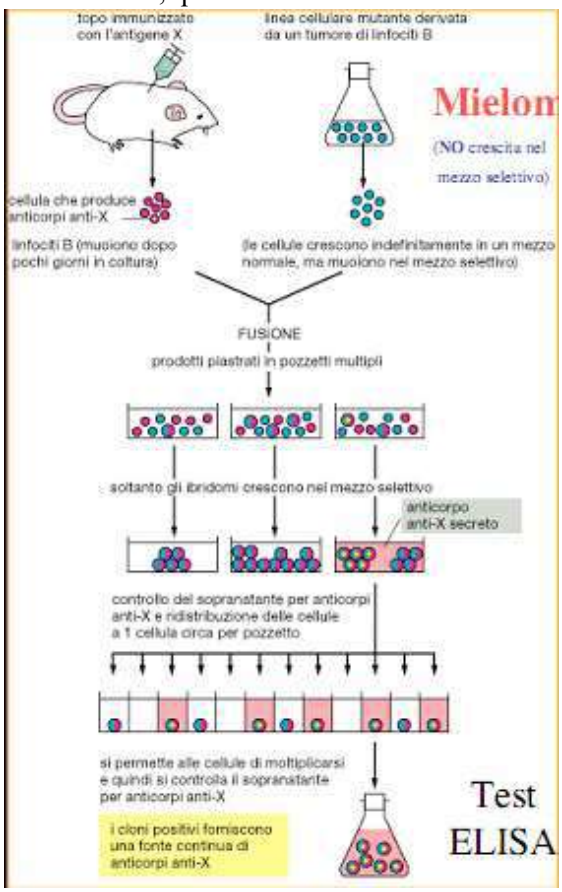
Se sono monoclonali sono identici e riconoscono non solo la stessa proteina, ma anche lo stesso epitopo, o determinante antigenico, non si ha così rischio di risposte aspecifiche.
Si possono produrre in grandi quantità e mantenere le cellule che li producono a lungo.
Questo tipo di anticorpi sono estremamente importanti non solo per la ricerca, ma anche per diagnosi e usi terapeutici per via della loro alta specificità.

Tecnica degli ibridomi:
Esiste la possibilità di fondere insieme due cellule diverse, e quando si fa ciò si ottiene una cellula ibrida che mantiene un po' di cromosomi di una cellula e un po' dell'altra, ha un genoma ibrido.
Queste cellule ibride si possono ottenere anche fra specie diverse o fra cellule della stessa specie.
Questo è il principio su cui si basa la metodica classica per ottene anticorpi monoclonali, e si chiama tecnica degli ibridomi.
È una tecnica che funziona nel topo, poiché si ha una linea cellulare mielomatosa, una linea tumorale immortalizzata, che ha una caratteristica particolare, pur venendo fuori da linfociti queste cellule non sono secernenti, non producono anticorpi.
Inoltre queste linee possono essere selezionate grazie ad un terreno, detto HAT.
HAT sta per:

- ipoxantina, un derivato delle purine;
- aminopterina, inibitore del metabolismo del folato, blocca la sintesi del DNA;

- timidina, intermedio nella sintesi del DNA.

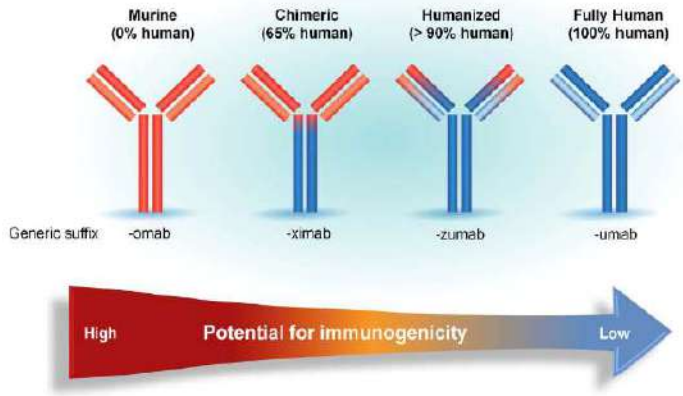
L'aminopterina blocca la sintesi del DNA, ma l'ipoxantina e la timidina forniscono il materiale necessario per aggirare il blocco con una "via alternativa", a patto che vi siano i giusti enzimi, cioè copie funzionali dei geni che codificano per essi.
Nelle cellule normali questa via alternativa funziona senza problemi, ma nelle cellule mielomatose questa via non funziona, quindi non cresco su tale terreno.



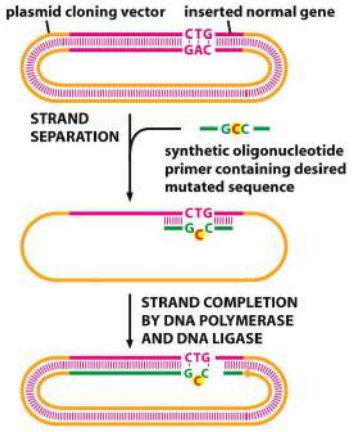
Questa tecnica si basa sulla fusione di linfociti e cellule mielomatose.
Questi linfociti provengono da topolini iniettati con un certo antigene.
Si fondono le due cellule, si ottengono le cellule ibride, e si fanno cresce in HAT.
Se nelle cellule ibride gli enzimi che mancano a quelle delle cellule mielomatose sono state fornite dai linfociti sopravvivono, mentre quelle mielomatose muiono.
Restano in tal modo solo le cellule ibride che seguono la via alternativa del DNA.
Si deve vedere se fra queste cellule ci sono quelle che producono gli anticorpi contro l'antigene iniettato nel topolino.
Si prendono le singole cellule sopravvissute e si seminano in pozzetti singoli.
Questo è importante perché una cellula in coltura formerà cloni tutti uguali, ma diversi per ogni pozzetto.
Se uno di questi cloni produce gli anticorpi, li produrrà come molecole secrete e finiranno nel terreno di coltura.
Si possono prendere tutti i terreni di coltura dai vari pozzetti e fare il test ELISA.
Quando l'anticorpo è presente si avranno già le cellule vive da usare per far crescere gli anticorpi, parte delle quali si possono congelare per farle crescere anche successivame.
Così si possono ottenere vari anticorpi, ma ognuno di questi deriva da un singolo linfocita, quindi ognuno di questi è un anticorpo monoclonale.

Questi anticorpi monoclonali hanno problemi per l'utilizzo in terapie, poiché sono anticorpi di topo, e possono dare risposta immunitaria che può dare anche shock anafilattico.
Il problema si risolverebbe facilmente se esistessero linee mielomatose simili umane.
Non si possono fondere le cellule di uomo con quelle di topo, perché sarebbero instabili.
Una soluzio è quella di usare la tecnologia del DNA ricombinante.
L'idea è di ingegnerizzare gli anticorpi, si prende l'anticorpo murino, si toglie la parte costante e si sostituisce con una parte costante umana, per renderlo così meno immunogenico.
Nella regione variabile ci sono regioni CDR responsabili del legame specifico con l'antigene che deve rimanere assolutame conservata, ma tutto il resto può essere sostituito con la corrispondente umana.
La parte murina resta così solo a livello del CDR, ma questa ingegnerizzazione è un sistema lungo e costoso.

Questi anticorpi hanno dei suffissi che sono diversi a seconda del tipo di anticorpo e da questi si riconoscono che tipo di antico è:



Herceptin:
È uno degli esempi di anticorpi umanizzati che si utilizzano di più.
È un anticorpo che si usa in alcune forme di tumore del seno quando si ha una sovraproduzio di un recettore per un fattore di crescita epidermico, il fattore di crescita EGF.
La sovraespressione di questo recettore fa si che si leghi una maggiore quantità di questo fattore.
L'anticorpo compete per il legame con il recettore con l'EGF, invece di legare il fattore di crescista infatti si lega l'anticorpo e blocca così la proliferazio delle cellule tumorali.
Questi anticorpi sono anticorpi immunizzati, il sistema immunitario li riconoscono come un qualcosa che non ci dovrebbe essere, quindi le natural killer sono attratte da questi anticorpi e vanno così ad uccidere le cellule tumorali legati a questi.
Questo è un anticorpo immunizzato al 95 % , ed è stato creato con la tecnologia del DNA ricombinante.
Il dominio extracellulare del recettore viene clonato, e la proteina ricombinante che si ottiene nel vettore di espressione viene iniettata nel topo.
Nel topo si producono gli ibridomi e si selezionano i cloni che esprimono l'anticorpo che lega questo recettore.
Si estrae da queste cellule selezionate l RNA e si fa la sintesi del cDNA, si amplifica la porzione variabile murina, sia per la catena leggera che per la pesante, si sequenziano per sicurezza i cloni ottenuti, e si fanno sostituire queste regioni con le catene umane inserite in plasmidi.
In questa maniera si ha la possibilità di sostituire le sequenze del topo con quelle umane.
Se non ci sono troppe differenze tra le due sequenze amminoacidiche delle parti del topo e umane, la sostituzione si può fare mediante mutagenesi sito diretta.



La mutagenesi sito diretta si può fare attraverso amplificazione successiva di questi plasmidi con dei primer che contengono una base variata.
In questo modo il plasmide viene denaturaro, si amplifica, si forma una seconda catena che contiene questa base modificata per far sostituire l'amminoacido.
Questi meccanismi che hanno prodotto i primi anticorpi immunizzati hanno un costo notevole, e sono procedure che a volte falliscono poiché bisogna fare vari passaggi.
Da una linea di ibridomi di topo:

- si isola cDNA di cloni che producono un anticorpo specifico, sia per la catena leggera che pesante;
- si amplifica la regione variabile di entrambe le catene con PCR;
- si clonano e si sequenziano;
- si analizzano le sequenze e si identificano le CDR, e si fanno amplificare;
- si fa mutagenesi mirata per poterle trapianta nel gene che produrrà l'anticorpo;
- si clonano i vettori di espressione, si trasfettano le cellule in coltura e si ottengono gli anticorpi.

Si sono sviluppate metodiche che hanno consentito di ottenere di meglio e con possibilità di successo maggiore come la Phage display oppure i topi transgenici, con le quali non solo si elimina l'ingegneria genetica, ma consente di ottenere anticorpi monoclonali completamente umani.

Phage display:
Si basa sul fatto che si possono ottene anticorpi al di fuori dell'organismo, infatti la parte più importante, ovvero quella variabile, si può ottenere utilizzando dei batteriofagi.
Questo batteriofago che si usa è M13, un fago filamentoso, che ha un genoma a singolo filamento di DNA che esprime una serie di proteine esposte, le quali riconoscono il pilus dei batteri che devono infettare.
Queste proteine sono varie, ma la P3 e P8 hanno una caratteristica interessante, si può ingegnerizzare il gene che produce P3 creando una proteina di fusione, la quale è ancora capace di infettare poiché è ancora una proteina esposta.
Si può inserire in questo fago la regione variabile della catena pesante e della leggera del genoma di un umano, legate insieme con un linker.
Queste si ottengono amplificando casualmente tutti i V_H e V_L che sono presenti nel genoma, tutti i geni, e si ottiene un reperto di segmentini che vengono poi legati con un linker, ottenendo così tutte le combinazioni possibili, si crea una genoteca.
Questo frammentino si inserisce nella regione genica che esprime la proteina P3 per ottenere la proteina di fusione che espone sulla superficie anche V_H e V_L, così è come se ci fossero le regioni variabili esposte in questo fago.
Queste vanno poi selezionate mettendole a contatto con l'antigene d'interesse, quelle che riconoscono lo specifico antigene si legherà con l'anticorpo, mentre tutti gli altri vengono lavati via.
Questo fago deve poi cresce di numero, e si può fare facedogli infettare una colonia ad esempio di E. Coli da cui poi si puo estrarre e purificare la regione dell'anticorpo, ovvero V_H e V_L legate dal linker.
Si ricrea così un anticorpo artificiale, poiché prodotto al difuori dell'organismo.
Ci sono dei limiti, ma si sono prodotti molti anticorpi utili dal punto di vista terapeutico.

Topi transgenici - tecnologia dell'ibridoma XenoMouse:
È una tecnica interessante dal punto di vista biologico.
Si prendono delle cellule staminali embrionali di topo, si crescono in coltura, e ci si fa gene targeting per distruggere le regioni della catena leggera e pesante.
Si ha così un topo in cui ci sono, ed uno in cui sono inattive.
Si ottengono dei topi con knock out, i quali si fanno incrociare con topi che producono anticorpi umani e murini, perché nelle cellule staminali ingegnerizzate ci si sono introdotti i geni delle catene.
Si ottiene progenie che conterrà alcuni topi che producono solo le catene umane, questi sono dei topolini transgenici.
A questo punto questi anticorpi sono umani, vengono selezionati con la tecnica degli ibridomi isolando le celluele che li esprimono.

ANTICORPI MONOCLONALI CONIUGATI

GLi anticorpi si possono usare anche come veicoli, coniugandoli con tosine, farmaci, agenti chemioterapici o altri agenti/molecole.
Esistono tentativi di creare anticorpi con legato nella parte costante una molecola, per bombardare in maniera specifica le cellule che riconoscono.
Altro metodo che si utilizza è quello di usare l'anticorpo per veicolare l'enzima che possa attivare un pro-farmaco, in tal modo si fa arrivare l'azione del farmaco solo dove serve, evitando di diffondere così l'eventuale effetto tossico del farmaco altrove.